

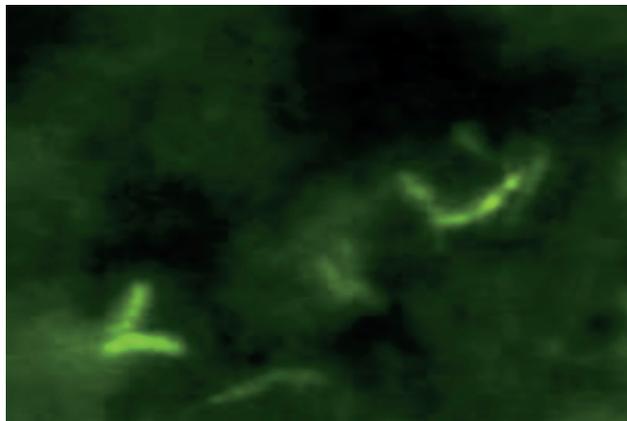
2021



ИНФЕКЦИЯ  
И  
ИММУНИТЕТ

**Иллюстрации к статье «Уровень нейротрансмиттеров в нейроаминсодержащих структурах легких при разных формах туберкулеза» (авторы: Н.Е. Гималдинова, Л.А. Любовцева, Е.В. Любовцева) (с. 1067–1074)**

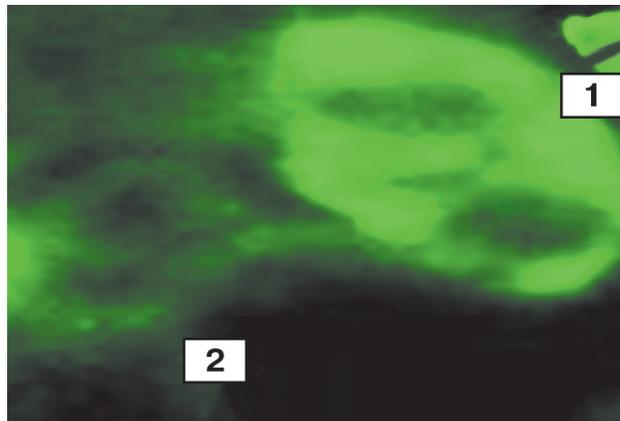
Illustrations for the article "Neurotransmitter level in neuroamin-containing lung structures in different forms of tuberculosis" (authors: Gimaldinova N.E., Lybovtseva L.A., Lybovtseva E.V.) (pp. 1067–1074)



**Рисунок 1. Группа микобактерий в интерстициальном пространстве легких**

Figure 1. A group of mycobacteria in the interstitial space of the lungs

**Примечание.** Метод Фалька и соавт. Микроскоп: Люмам-6, увеличение  $\times 1000$ .  
Note. A staining technique by Falck et al. Microscope: Lumam-6, magnification  $\times 1000$ .



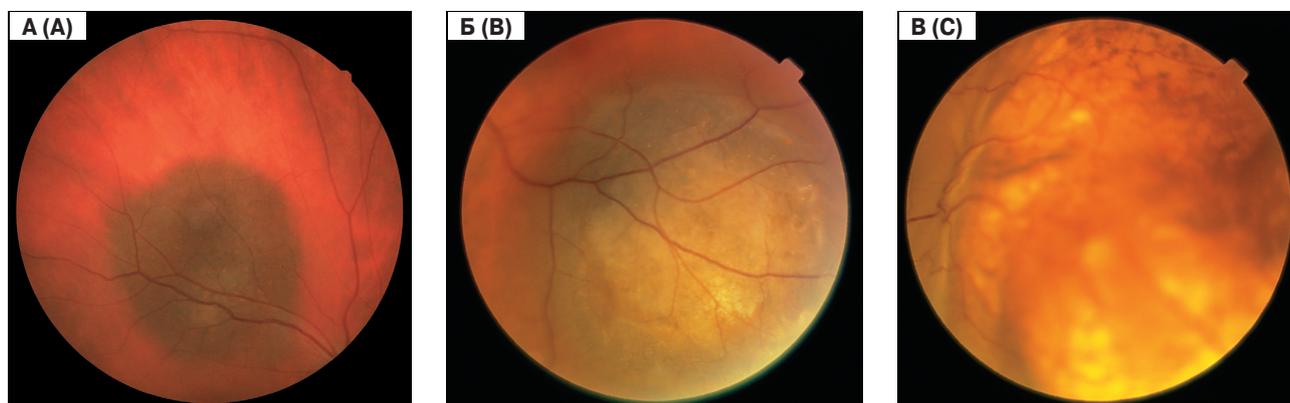
**Рисунок 2. Интерстициальное пространство при остром кавернозном туберкулезе легких**

Figure 2. The interstitial space in acute cavernous pulmonary tuberculosis

**Примечание.** 1 — ГЛК, содержащая КА и СТ. 2 — альвеола. Метод Фалька и соавт. Микроскоп: Люмам-6, увеличение  $\times 1000$ .  
Note. 1 — GLC containing CA and ST. 2 — the alveolus. A staining technique by Falck et al. Microscope: Lumam-6, magnification  $\times 1000$ .

**Иллюстрации к статье «Особенности эффекторных субпопуляций лимфоцитов у пациентов с увеальной меланомой при активации и хроническом течении герпесвирусной инфекции» (авторы: Н.В. Балацкая, С.В. Саакян, Е.Б. Мякошина, И.Г. Куликова, Г.И. Кричевская) (с. 1123–1130)**

Illustrations for the article "Features of effector lymphocyte subsets in patients with uveal melanoma in recurrent and chronic herpesvirus infection" (authors: Balatskaya N.V., Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Kulikova I.G., Krichevskaya G.I.) (pp. 1123–1130)



**Рисунок. Увеальная меланوما малых (А), средних (Б) и больших (В) размеров**

Figure. Uveal melanoma of small (A), medium (B) and large (C) sizes

# ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

ноябрь–декабрь

2021, том 11

№ 6

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

## Главный редактор

**Тотолян Арег А.** д.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  
**Лоузир 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 Ангеловфа, 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  
**Тотолян Артем А.** д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия  
**Фрейдлин И.С.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия  
**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

<b>Алешкин В.А.</b>	д.б.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия
<b>Бухарин О.В.</b>	д.м.н., профессор, академик РАН, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург, Россия
<b>Вишневский Б.И.</b>	д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия
<b>Долгушин И.И.</b>	д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент Южно-Уральского государственного медицинского университета, Челябинск, Россия
<b>Зверев В.В.</b>	д.б.н., профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
<b>Зуева Л.П.</b>	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
<b>Кафтырева Л.А.</b>	д.м.н., профессор, зав. лабораторией кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
<b>Кашкин К.П.</b>	д.м.н., профессор, академик РАН, профессор кафедры иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования МЗ РФ, Москва, Россия
<b>Кубарь О.И.</b>	д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
<b>Малеев В.В.</b>	д.м.н., профессор, академик РАН, советник директора Центрального НИИ эпидемиологии, зав. отделом инфекционной патологии, Москва, Россия
<b>Нарвская О.В.</b>	д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
<b>Савичева А.М.</b>	д.м.н., профессор, зав. лабораторией микробиологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия
<b>Сельков С.А.</b>	д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия
<b>Тец В.В.</b>	д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
<b>Харит С.М.</b>	д.м.н., профессор, руководитель отдела профилактики инфекционных заболеваний ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
<b>Чекнев С.Б.</b>	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
<b>Шкарин В.В.</b>	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](http://www.iimmun.ru) и [www.elibrary.ru](http://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](mailto:izdatelstvo@pasteurorg.ru)

### Типография ООО «Аллегро»

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

Подписано в печать 24.12.2021 г. Формат 60 x 90 1/8.  
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.  
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).  
Заказ № 1402

© 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)

November–December

2021, volume 11

No. 6

---

*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 Phthisiopulmonology, 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, Scientific Director, Moscow, Russian Federation; 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](http://www.iimmun.ru) and [www.elibrary.ru](http://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](mailto:izdatelstvo@pasteurorg.ru)

## Produced at the Allegro Printing House

196084, Russian Federation, St. Petersburg,  
Koli Tomchaka str., 28.  
Phone/fax: (812) 388-90-00.

Passed for printing 24.12.2021. Print format 60 x 90 1/8.  
Offset printing. Printed sheets 25.  
Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> 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

- Киселева И.В., Ларионова Н.В., Григорьева Е.П., Ксенафонтов А.Д., Аль Фаррух М., Руденко Л.Г.*  
**ОСОБЕННОСТИ ЦИРКУЛЯЦИИ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСОВ В ПРЕД- И ПАНДЕМИЧЕСКИЕ ПО ГРИППУ И COVID-19 ПЕРИОДЫ** ..... 1009
- Хаксари М., Сабет Н., Солтани З., Башири Х.*  
**ПОЛ ПАЦИЕНТА ВЛИЯЕТ НА ОТВЕТ СИСТЕМ ОРГАНИЗМА И КЛИНИЧЕСКИЙ ИСХОД ПРИ COVID-19** ..... 1020
- Поздеева А.О., Поздеев О.К., Гуляев П.Е., Валеева Ю.В., Савинова А.Н.*  
**СОВРЕМЕННОЕ РАЗВИТИЕ СХЕМ ЭРАДИКАЦИИ *HELICOBACTER PYLORI*** ..... 1037
- Лапштаева А.В., Абросимова Ю.Г., Еремкина Т.Я., Костина Ю.А.*  
**МИКРОБНЫЕ АГЕНТЫ КАК ТРИГГЕРЫ РАЗВИТИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА** ..... 1050

## Оригинальные статьи

- Попкова М.И., Уткин О.В., Соболева Е.А., Сахарнов Н.А., Брызгалова Д.А., Сенатская А.О., Кулова Е.А.*  
**МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ ВЭБ1/ВЭБ2 И ВГЧ6А/ВГЧ6В** ..... 1057
- Гималдинова Н.Е., Любовцева Л.А., Любовцева Е.В.*  
**УРОВЕНЬ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ В НЕЙРОАМИНСОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУРАХ ЛЕГКИХ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ТУБЕРКУЛЕЗА** ..... 1067
- Деракшан С., Резайи А., Мохаммади Ш.*  
**ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ТОКСИНАМИ III ТИПА СЕКРЕЦИИ, ОБРАЗОВАНИЕМ БИОПЛЕНКИ И АНТИБИОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ В КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТАХ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*** ..... 1075
- Хаджизаде М., Фалак Р., Таваколи-Яраки М., Хоссейнзаде Р., Алипюр М., Ахмадпюр Э., Рафиеи-Сефиддашти Р.*  
**ИНФЕКЦИЯ, ВЫЗВАННАЯ *TOXOPLASMA GONDII*, У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ КОСТИ** ..... 1083
- Боскабади Х., Садегхиан М.Х., Машкани Б., Закерихамиди М.*  
**СРАВНЕНИЕ ВЕЛИЧИН ОТНОШЕНИЯ «ЯДРОСОДЕРЖАЩИЕ ЭРИТРОЦИТЫ/100 ЛЕЙКОЦИТОВ» (NRBC/100 WBC) У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С РАННИМ РАЗВИТИЕМ СЕПСИСА И БЕЗ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ** ..... 1089
- Искандар А., Винсентиа М.И., Джая В., Арияти А., Прамадхани А., Априлиа А.*  
**УРОВЕНЬ ЛАКТАТА, АЛЬБУМИНА И ОТНОШЕНИЕ «ЛАКТАТ/АЛЬБУМИН» КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ СМЕРТНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ** ..... 1095
- Шолан Р.Ф.*  
**ЛОКАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ У ПАЦИЕНТОВ С КЛАССИЧЕСКИМ И НЕЯЗВЕННЫМ ТИПОМ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОГО ЦИСТИТА/СИНДРОМА БОЛЕЗНЕННОГО МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ** ..... 1101
- Кутилин Д.С.*  
**МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НЕТИПИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА** ..... 1108
- Балацкая Н.В., Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Куликова И.Г., Кричевская Г.И.*  
**ОСОБЕННОСТИ ЭФФЕКТОРНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМОЙ ПРИ АКТИВАЦИИ И ХРОНИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ** ..... 1123
- Останкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Валутите Д.Э., Хуйнх Х.К.Т., Егорова С.А., Тотолян Арег А.*  
**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МАРКЕРОВ ВИРУСОВ ГЕПАТИТА В И С СРЕДИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЖИТЕЛЕЙ ЮЖНОГО РЕГИОНА СОЦИАЛИСТИЧЕСКОЙ РЕСПУБЛИКИ ВЬЕТНАМ** ..... 1131

Савченко А.А., Цуканов В.В., Кудрявцев И.В., Тонких Ю.Л., Беленюк В.Д., Черепнин М.А., Анисимова А.А., Борисов А.Г.

**ЗАВИСИМОСТЬ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО СОСТАВА Т-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С ОТ ГЕНОТИПА ВИРУСА (ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ПРЕПАРАТАМИ ПРЯМОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ) ..... 1141**

Ходза И.Э., Пуздряк П.Д., Бондаренко П.Б., Дегтярев А.М., Ерофеев А.А., Чижова К.А., Шломин В.В., Ведерникова Е.С.

**ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ КРОВИ НА ТЕЧЕНИЕ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С COVID-19 ..... 1152**

Глебова Т.И., Кливлеева Н.Г., Лукманова Г.В., Сактаганов Н.Т., Баймухаметова А.М.

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПРОТИВОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА, ВЫДЕЛЕННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ КАЗАХСТАНА В 2018–2019 гг. .... 1159**

## Краткие сообщения

Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Якубицкий С.Н., Титова К.А., Пьянков С.А.

**ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ И ПРОТЕКТИВНОСТИ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ LIVP-GFP НА ТРЕХ ВИДАХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ..... 1167**

Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Штрек С.В., Рудакова С.А., Кумпан Л.В., Иголкина Я.П., Рар В.А., Жираковская Е.В., Ткачев С.Е., Тикунова Н.В., Кострыкина Т.В., Блохина И.А., Ленц П.А.

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕЩЕВОГО РИККЕТСИОЗА, СВЯЗАННОГО С МИКСТ-ИНФИЦИРОВАНИЕМ RICKETTSIA SIBIRICA И CANDIDATUS RICKETTSIA TARASEVICHIAE ..... 1173**

Лаврентьева И.Н., Бичурина М.А., Антипова А.Ю., Камара Ж., Магассуба Н'Ф., Егорова С.А., Тотолян Арег А.

**КОРЬ В ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ В 2019–2020 гг.: ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ ..... 1179**

Кеиха М., Карбалаеи М.

**БЛОКАДА LIRs КАК НОВЫЙ ПОДХОД К ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ Т-КЛЕТОЧНОГО ЛЕЙКОЗА ВЗРОСЛЫХ ..... 1185**

Филиппова Ю.Ю., Холодилина М.Е., Бурмистрова А.Л.

**ТРАЕКТОРИЯ ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ЗДОРОВЫХ ЛИЦ В КОНТЕКСТЕ МЕТАОРГАНИЗМА ..... 1190**

**Правила для авторов ..... 1197**

**Авторский указатель ..... 1200**

**Предметный указатель ..... 1200**

# CONTENTS

## Reviews

*Kiseleva I.V., Larionova N.V., Grigorieva E.P., Ksenafontov A.D., Al Farroukh M., Rudenko L.G.*

**SALIENT FEATURES OF CIRCULATING RESPIRATORY VIRUSES IN THE PRE- AND PANDEMIC INFLUENZA AND COVID-19 SEASONS** ..... 1009

*Khaksari M., Sabet N., Soltani Z., Bashiri H.*

**GENDER-RELATED RESPONSE OF BODY SYSTEMS IN COVID-19 AFFECTS OUTCOME** ..... 1020

*Pozdeeva A.O., Pozdeev O.K., Gulyaev P.E., Valeeva Yu.V., Savinova A.N.*

**CURRENT DEVELOPMENT OF *HELICOBACTER PYLORI* ERADICATION PROTOCOLS** ..... 1037

*Lapshtaeva A.V., Abrosimova Yu.G., Eremkina T.Ya., Kostina Yu.A.*

**MICROBIAL AGENTS AS TRIGGERS OF DEVELOPING MULTIPLE SCLEROSIS** ..... 1050

## Original articles

*Popkova M.I., Utkin O.V., Soboleva E.A., Sakharnov N.A., Bryzgalova D.A., Senatskaia A.O., Kulova E.A.*

**METHODOLOGICAL BASICS FOR DIFFERENTIAL DETECTION OF EBV1/EBV2 AND HHV6A/HHV6B** ..... 1057

*Gimaldinova N.E., Lybovtseva L.A., Lybovtseva E.V.*

**NEUROTRANSMITTER LEVEL IN NEUROAMIN-CONTAINING LUNG STRUCTURES IN DIFFERENT FORMS OF TUBERCULOSIS** ..... 1067

*Derakhshan S., Rezaee A., Mohammadi Sh.*

**RELATIONSHIP BETWEEN TYPE III SECRETION TOXINS, BIOFILM FORMATION, AND ANTIBIOTIC RESISTANCE IN CLINICAL *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATES** ..... 1075

*Hajzadeh M., Falak R., Tavakoli-Yaraki M., Hosseinzadeh R., Alipour M., Ahmadpour E., Rafiei-Sefiddashti R.*

***TOXOPLASMA GONDII* INFECTION IN PATIENTS WITH MALIGNANT AND BENIGN BONE TUMOURS** ..... 1083

*Boskabadi H., Sadeghian M.H., Mashkani B., Zakerihamidi M.*

**COMPARISON OF THE PERCENTAGE OF NRBC/100 WBC IN EARLY ONSET SEPSIS AND NON-INFECTIOUS PREMATURE INFANTS** ..... 1089

*Iskandar A., Vincentia M.I., Jaya W., Aryati A., Pramadhani A., Aprilia A.*

**THE PROFILE OF LACTATE, ALBUMIN, AND LACTATE/ALBUMIN RATIO AS PREDICTORS OF MORTALITY IN SEPSIS PATIENTS** ..... 1095

*Sholan R.F.*

**LOCAL IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH CLASSIC AND NON-ULCER TYPE OF INTERSTITIAL CYSTITIS/BLADDER PAIN SYNDROME** ..... 1101

*Kutilin D.S.*

**METAGENOMIC ANALYSIS TO IDENTIFY THE CAUSATIVE AGENTS OF ATYPICAL UROGENITAL TRACT INFECTIONS** ..... 1108

*Balatskaya N.V., Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Kulikova I.G., Krichevskaya G.I.*

**FEATURES OF EFFECTOR LYMPHOCYTE SUBSETS IN PATIENTS WITH UVEAL MELANOMA IN RECURRENT AND CHRONIC HERPESVIRUS INFECTION** ..... 1123

*Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Serikova E.N., Schemeleev A.N., Valutite D.E., Huynh H.K.T., Egorova S.A., Totolian Areg A.*

**PREVALENCE OF HEPATITIS B AND C VIRAL MARKERS AMONG APPARENTLY HEALTHY RESIDENTS OF THE SOCIALIST REPUBLIC OF VIETNAM (SOUTHERN VIETNAM)** ..... 1131

*Savchenko A.A., Tsukanov V.V., Kudryavtsev I.V., Tonkih J.L., Belenjuk V.D., Cherepnin M.A., Anisimova A.A., Borisov A.G.*

**A RELATION BETWEEN T CELL PHENOTYPIC PROFILE AND VIRUS GENOTYPE IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS (BEFORE AND AFTER TREATMENT WITH DIRECT ANTIVIRAL AGENTS)** ..... 1141

*Khodza I.E., Puzdryak P.D., Bondarenko P.B., Degtyarev A.M., Erofeev A.A., Chizhova K.A., Shlomin V.V., Vedernikova E.S.*

**INFLUENCE OF ULTRAVIOLET BLOOD IRRADIATION ON COVID-19 ASSOCIATED COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA ..... 1152**

*Glebova T.I., Klivleyeva N.G., Lukmanova G.V., Saktaganov N.T., Baimukhametova A.M.*

**2018–2019 ANTIVIRAL DRUG SENSITIVITY OF THE INFLUENZA VIRUS STRAINS ISOLATED FROM VARIOUS REGIONS OF KAZAKHSTAN ..... 1159**

## Short communications

*Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., Pyankov S.A.*

**ASSESSING IMMUNOGENICITY AND PROTECTIVENESS OF THE VACCINIA VIRUS LIVP-GFP IN THREE LABORATORY ANIMAL MODELS ..... 1167**

*Rudakov N.V., Samoylenko I.E., Shtrek S.V., Rudakova S.A., Kumpan L.V., Igoikina Ya.P., Rar V.A., Zhirakovskaya E.V.,*

*Tkachev S.E., Tikunova N.V., Kostyukina T.V., Blokhina I.A., Lents P.A.*

**CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF TICK-BORNE RICKETTSIOSIS RELATED TO RICKETTSIA SIBIRICA AND CANDIDATUS RICKETTSIA TARASEVICHIAE ..... 1173**

*Laurentieva I.N., Bichurina M.A., Antipova A.Yu., Camara J., Magassouba N'F., Egorova S.A., Totolian Areg A.*

**2019–2020 MEASLES IN THE REPUBLIC OF GUINEA: EPIDEMIC FEATURES AND HERD IMMUNITY ..... 1179**

*Keikha M., Karbalaei M.*

**BLOCKADE OF LIRs AS A NEW APPROACH FOR DIAGNOSTICS AND TREATMENT OF ATLL MALIGNANCY ..... 1185**

*Filippova Yu.Yu., Kholodilina M.E., Burmistrova A.L.*

**TRAJECTORY OF AGE-ASSOCIATED CHANGES IN SMALL INTESTINAL MICROBIAL COMMUNITY OF HEALTHY PERSON METAORGANISM ..... 1190**

**Instructions to Authors ..... 1197**

**Author index ..... 1200**

**Subject index ..... 1200**

# ОСОБЕННОСТИ ЦИРКУЛЯЦИИ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСОВ В ПРЕД- И ПАНДЕМИЧЕСКИЕ ПО ГРИППУ И COVID-19 ПЕРИОДЫ

И.В. Киселева<sup>1,2</sup>, Н.В. Ларионова<sup>1</sup>, Е.П. Григорьева<sup>1</sup>, А.Д. Ксенафонтов<sup>3</sup>,  
М. Аль Фаррух<sup>1</sup>, Л.Г. Руденко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородиной Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Широкое разнообразие зоонозных вирусов, способных преодолевать межвидовой барьер, ведет к появлению в человеческой популяции новых, потенциально пандемических вирусов. Это часто сопровождается исчезновением существующих циркулирующих штаммов. Среди разнообразных причин данного явления — укрепление популяционного иммунитета за счет расширения иммунной прослойки населения и совершенствования средств и методов медицинской помощи. Однако природа не терпит пустоты (*Natura abhorret vacuum*), и на смену исчезающим патогенам приходят новые. За последние десять лет человечество столкнулось с двумя пандемиями: гриппа свиного происхождения A(H1N1)pdm09 в 2009 г. и COVID-19 в 2019 г., что предоставило ученым уникальную возможность как можно больше узнать о взаимоотношениях респираторных вирусов и их патогенезе. Совместно с вирусами, имеющими пандемическое значение, циркулирует множество сезонных респираторных вирусов, которые вносят свой вклад в структуру заболеваемости людей, а сочетанные инфекции отягчают состояние заболевших. В условиях распространения новых вирусов с неизученными характеристиками при отсутствии средств профилактики и терапии особенно актуально предотвратить отягчение заболеваемости за счет смешанных инфекций. В этом обзоре рассматривается взаимное участие в эпидемическом процессе пандемических вирусов (вируса гриппа A(H1N1)pdm09 и коронавируса SARS-CoV-2) и сезонных респираторных вирусов, обсуждаются некоторые вопросы, связанные с их распространением, возможные социальные и климатические причины, влияющие на распространение и тяжесть заболевания, а также приводятся факты, свидетельствующие о существовании сезонности и временных закономерностей начала и окончания циркуляции респираторных вирусов. Интересно, что начало циркуляции пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 привело к смещению сроков и интенсивности циркуляции одних респираторных вирусов, что, вероятно, вызвано существованием между ними «конфликтов репликации», и не затронуло другие респираторные вирусы. Довольно часто наблюдали сочетанное заражение SARS-CoV-2 и другими респираторными вирусами, особенно респираторно-синцитиальным вирусом и риновирусами. На сегодняшний день не установлено отягчающего влияния гриппа на течение COVID-19 при смешанной инфекции. Еще не ясно, вызвано ли это мягким течением гриппозной инфекции в эпидсезоне 2020 г. или конкурентным воздействием SARS-CoV-2 на вирусы гриппа. Специалисты пока занимаются накоплением фактов и работой над созданием средств эффективной профилактики и лечения новой коронавирусной инфекции.

**Ключевые слова:** эпидемии, межпандемический период, пандемии, пандемический период, острые респираторные вирусные инфекции, грипп, SARS-CoV-2, COVID-19.

---

#### Адрес для переписки:

Киселева Ирина Васильевна  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, 12,  
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.  
Тел.: 8 (812) 234-68-60. Факс: 8 (812) 234-68-68.  
E-mail: irina.v.kiseleva@mail.ru

#### Contacts:

Irina V. Kiseleva  
197376, Russian Federation, St. Petersburg,  
Academician Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.  
Phone: +7 (812) 234-68-60. Fax: +7 (812) 234-68-68.  
E-mail: irina.v.kiseleva@mail.ru

---

#### Для цитирования:

Киселева И.В., Ларионова Н.В., Григорьева Е.П., Ксенафонтов А.Д.,  
Аль Фаррух М., Руденко Л.Г. Особенности циркуляции респираторных  
вирусов в пред- и пандемические по гриппу и COVID-19  
периоды // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1009–1019.  
doi: 10.15789/2220-7619-SFO-1662

#### Citation:

Kiseleva I.V., Larionova N.V., Grigorieva E.P., Ksenafontov A.D.,  
Al Farroukh M., Rudenko L.G. Salient features of circulating respiratory  
viruses in the pre- and pandemic influenza and COVID-19 seasons // Russian  
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6,  
pp. 1009–1019. doi: 10.15789/2220-7619-SFO-1662

## SALIENT FEATURES OF CIRCULATING RESPIRATORY VIRUSES IN THE PRE- AND PANDEMIC INFLUENZA AND COVID-19 SEASONS

Kiseleva I.V.<sup>a,b</sup>, Larionova N.V.<sup>a</sup>, Grigorieva E.P.<sup>a</sup>, Ksenafontov A.D.<sup>c</sup>, Al Farroukh M.<sup>a</sup>, Rudenko L.G.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** A wide variety of zoonotic viruses that can cross the interspecies barrier promote the emergence of new, potentially pandemic viruses in the human population that is often accompanied by the disappearance of existing circulating strains. Among the various reasons underlying this phenomenon is the strengthening of herd immunity by expanding the immune layer of population and improving means and methods of medical care. However, *natura abhorret vacuum*, and new pathogens come to replace disappearing ones. Over the past ten years, humanity has faced two pandemics: swine flu A(H1N1)pdm09 in 2009 and COVID-19 in 2019, providing scientists with a unique opportunity to learn more about a relationship between respiratory viruses and their pathogenesis. Together with viruses of pandemic significance, a large number of seasonal respiratory viruses circulate, which contribute to the structure of human morbidity, and coinfections aggravate the condition of the illness. In the conditions of the spread of new viruses with unexplored characteristics, in the absence of means of prevention and therapy, it is especially important to prevent the aggravation of morbidity due to mixed infections. Here we review the mutual involvement of pandemic influenza A(H1N1)pdm09 and SARS-CoV-2 coronavirus and seasonal respiratory viruses in the epidemic process, discuss some issues related to their spread, potential causes affecting the spread and severity of the morbidity. The given facts testify to the existence of seasonality and temporal patterns of the beginning and end of respiratory viruses circulation. Interestingly, the beginning of circulation of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus led to a shift in the timing and intensity of circulation of some respiratory viruses, which is probably caused by existence of “replication conflicts” between them, and did not affect others. Coinfection with SARS-CoV-2-19 and other respiratory viruses, especially respiratory syncytial virus and rhinoviruses, was quite often observed. At the current stage, no aggravating effect of influenza on the course of COVID-19 in mixed infection has been established. Whether this is due to the mild course of influenza infection in the 2020 epidemic season, or the competitive impact of SARS-CoV-2 on influenza viruses is not yet clear. Experts are still at the stage of accumulating facts and working on creating means of effective prevention and treatment of the new coronavirus infection.

**Key words:** epidemics, interpandemic period, pandemics, pandemic period, acute respiratory viral infections, influenza, SARS-CoV-2, COVID-19.

## Введение

При большом разнообразии зоонозных вирусов, которые могут преодолевать ограничения круга хозяев и приобретать способность распространяться в иммунологически наивной популяции, всегда существует возможность появления нового потенциально пандемического вируса [12].

Чтобы штамм вируса гриппа приобрел пандемическое распространение в человеческой популяции, он должен соответствовать трем важным условиям: быть 1) антигенно новым для иммунной системы; 2) вирулентным; 3) способным к повсеместной передаче от человека к человеку [43]. В отдельности каждая из этих предпосылок необходима, но недостаточна для того, чтобы вирус превратился в пандемический штамм. Только сочетание всех трех компонентов обеспечивает вирусу гриппа пандемическую силу.

Все это в полной мере относится к любым пандемическим вирусам разного происхождения. На протяжении долгого времени термин «пандемия» ассоциировался у вирусологов с гриппом. В 2009 г. началась очередная и пока последняя пандемия гриппа, которая, по модельным расчетам, только за первые 12 месяцев унесла около 284 440 человеческих жизней [22]. Однако, как

показала трагическая история последних месяцев, не только вирус гриппа, но и другие, более опасные вирусы также могут обладать пандемическим потенциалом. В конце 2019 г. Китай сообщил о появлении инфекционного заболевания неизвестной этиологии в городе Ухань провинции Хубэй. Вскоре после этого китайские ученые определили новый бета-коронавирус, SARS-CoV-2, как наиболее вероятный возбудитель этого заболевания (COVID-19) [13]. Свойства SARS-CoV-2 полностью удовлетворяют трем основным требованиям, которые позволяют штамму стать пандемическим: он нов для иммунной системы человека, очень вирулентен для инфицированных людей и имеет высокую степень трансмиссивности (вирус даже более заразен, чем возбудитель гриппа). С 31 декабря 2019 г. по 29 декабря 2020 г. в мире, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), было зарегистрировано 79 673 754 подтвержденных случаев COVID-19, включая 1 761 381 смертельных случаев, в России — 3 105 037 случаев, из которых 55 827 смертельных [69].

В глобальном масштабе это уже превысило трехлетнюю смертность от азиатского гриппа H2N2 пандемии 1957–1959 гг., которая составила около 1,5 млн человек [67]. Если же сравнивать уровень летальности во время двух последних

пандемий, то на сегодняшний день он составляет около 2,5–3,0% для COVID-19 при 0,03–0,2% для пандемического гриппа A(H1N1)pdm09.

**Экологическая ниша для вирусных инфекций человека**

В природе каждый вид и каждый живой объект, от высших млекопитающих до микроорганизмов, занимает свою экологическую нишу. Пустующая или освобожденная экологическая ниша обязательно заполняется другим видом, способным выполнять те же функции, что и исчезнувший вид. В конце XX в. значительно сократилась заболеваемость такими острыми инфекциями, как оспа, полиомиелит или бубонная чума, унесшими в прошлом сотни тысяч человеческих жизней. После победы над этими инфекциями освободилась большая экологическая ниша. Однако природа не терпит пустоты (*Natura abhorret vacuum*). Поэтому освобожденную нишу начали заполнять другие, пока не побежденные вирусы, в том числе вирус гриппа и другие гриппоподобные респираторные вирусы (рис.). Разумеется, респираторные вирусы, включая вирус гриппа, циркулировали среди людей еще задолго до ликвидации оспы или полиомиелита.

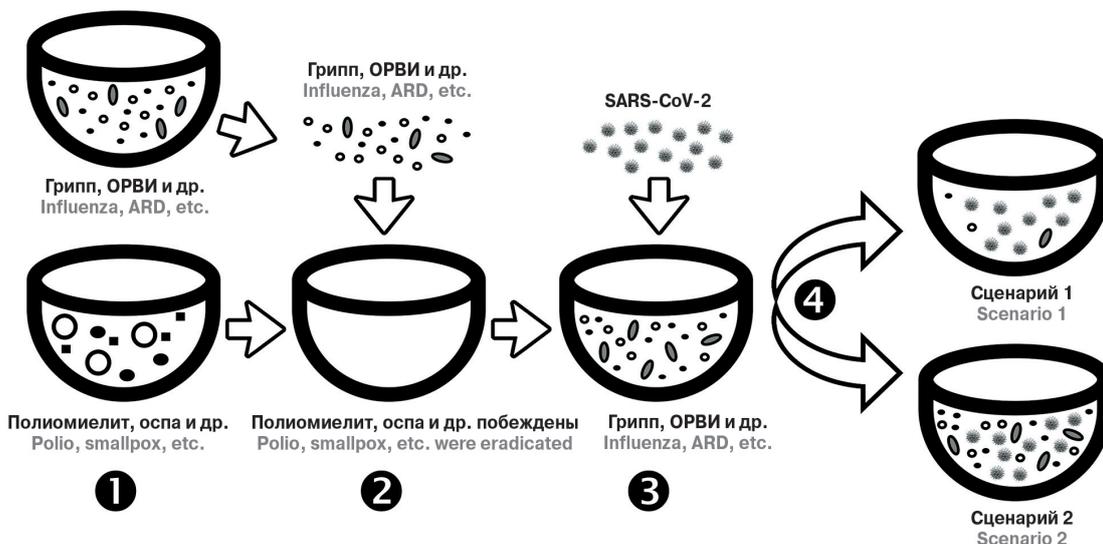
Появление новых пандемических вирусов гриппа часто сопровождалось исчезновением циркулирующих сезонных гриппозных штаммов. Этот феномен вытеснения ранее циркулировавших штаммов из занимаемой ими ниши хорошо известен и описан в литературе. Palese P. и Wang T.T. [57] полагают, что устранение сезонных штаммов во время гриппозных пандемий является процессом, опосредованным существованием коллективным иммунитетом в человеческой популяции.

Ситуация с COVID-19 несколько иная. Возбудитель возник неожиданно и быстро внедрился в нишу, занятую другими респираторными вирусами. Можно предположить два возможных сценария развития последующих событий. SARS-CoV-2 начнет вытеснять другие, более безвредные штаммы как более агрессивный вирус, или они будут сосуществовать (рис.).

**Глобальные стрессы и инфекции**

Человечество воюет на протяжении многих веков; столетиями эпидемии инфекционных заболеваний во время войн подрывали боевую мощь армий и значительно сокращали гражданское население. До XX в. смертность от болезней регулярно превышала смертность от военных действий. XX в. ознаменовался улучшением военной гигиены и борьбы с болезнями и укреплением устойчивой тенденции, при которой больше солдат погибало в боях, чем от инфекционных заболеваний [59]. Тем не менее в глобальном масштабе войны, революции и перевороты обычно сопровождалось выраженным увеличением числа инфекционных заболеваний. Один из самых ярких примеров — пандемия испанского гриппа. В результате военной мобилизации и массового перемещения людей в связи с Первой мировой войной вирус стремительно распространился по всему миру (1918–1919 гг.) [7, 28].

Интересный факт был замечен во время Великой Отечественной войны (1941–1945 гг.). Помимо смертей в боях и от ранений, почти 2 млн людей скончалось от голода, сердечных приступов и различных болезней. Тем не менее острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) в военное время были очень редки. Люди, которые много болели в мирное время, в военное время, как правило, не простужались.



**Рисунок. Природа не терпит пустоты**  
Figure. *Natura abhorret vacuum*

За период жестокой блокады Ленинграда имел место целый ряд вспышек инфекционных заболеваний, с которыми успешно и без трагических последствий справилась эпидемиологическая служба города. В качестве примера можно привести вспышки кори (октябрь–ноябрь 1941 г.), дизентерии (лето 1941–1942 гг.), дифтерии (осень 1941–1943 гг.), желтухи (ноябрь 1942 г.), гриппа (декабрь 1944 г.) [1].

Службы здравоохранения прилагали существенные усилия для нераспространения инфекционных заболеваний в тылу и на фронтах, однако отмечены также факты, свидетельствующие о том, что во время стресса военного времени человеческий организм не был подвержен многим инфекциям. Существует теория, согласно которой вирусные заболевания могут быть связаны с психикой человека [19], поэтому в момент сильного стресса мозг «запрещает» телу заболеть и мобилизуется для защитных действий (так называемая реакция «бей или беги» — fight-or-flight) [23]. Во время боевых действий солдатам приходилось часами находиться в холодной или даже ледяной воде, сидеть в окопах, но они не простужались.

Разумеется, войны нарушают хрупкое равновесие во взаимоотношениях «хозяин–патоген». Тем не менее не только войны, но и пандемии являются существенным стрессом для общества. Что же происходит с другими вирусными заболеваниями во время таких глобальных бедствий? Мы рассмотрим этот вопрос на примере двух последних пандемий, произошедших с разницей в 10 лет, — пандемий гриппа A(H1N1)pdm09 и пандемии COVID-19.

## Взаимовлияние пандемий гриппа и сезонных респираторных вирусных инфекций

### Сезонность ОРВИ

Согласно эпидемиологическим исследованиям, проведенным в регионах с умеренным климатом, большинство респираторных вирусных инфекций характеризуется сезонными вспышками. Так, в зимние месяцы в циркуляции преобладают вирусы гриппа, респираторно-синциальный вирус (RSV), сезонные коронавирусы человека. Вирусы парагриппа также демонстрируют специфическую для данного типа сезонную циркуляцию, охватывающую весну, начало и конец лета и осенний период. Для некоторых энтеровирусов характерно увеличение частоты заболеваемости летом. Такие же вирусы человека, как аденовирус, бокавирус, метапневмовирус и риновирус, вызывают заболевания на протяжении всего года. При этом, хотя уровень риновирусной инфекции достигает пиковых значений весной и осенью, зимой тяжесть заболевания возрастает [48].

Исследования подчеркивают роль факторов окружающей среды, таких как темпера-

тура и влажность внутри и вне помещений, на устойчивость вирусов и скорость их передачи. Сезонные изменения окружающей среды, экологические факторы, поведенческая активность, витаминный статус человека также влияют на врожденные и адаптивные иммунные реакции, возникающие в ответ на вирусные инфекции дыхательных путей [48].

«Доминантой» зимнего эпидемического сезона является вирус гриппа, с которым связаны варьирующие по тяжести сезонные эпидемии и периодические непредсказуемые пандемии. Возбудители других ОРВИ рассматриваются как сопутствующие гриппу: либо предшествующие ему, либо следующие за ним. При этом изменения в структуре заболеваний ОРВИ за последние годы таковы, что менее четверти из них приходится на грипп, а до 85% составляют респираторные инфекции негриппозной этиологии [6].

Существует взаимное влияние респираторных патогенов друг на друга. Инфицирование одним вирусным агентом вызывает в клетках продукцию интерферонов и других цитокинов, сходных с теми, которые вырабатываются в ответ на другой респираторный вирус. Такая иммунная реакция приводит рецепторные клетки в «антивирусное состояние» [31].

Много исследований связано с интерференцией возбудителя пандемии гриппа A(H1N1)pdm09 с сопутствующими сезонными ОРВИ [6, 41, 44, 58]. Отмечалось влияние вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на циркуляцию RSV, приводящее к смещению пиков или интенсивности циркуляции последних, а также взаимодействие риновируса и вируса гриппа A(H1N1)pdm09. Конфликты репликации среди разных респираторных вирусов могут способствовать тому, что пики вызванной ими заболеваемости не будут перекрещиваться друг с другом [9]. Например, в Санкт-Петербурге в эпидемические сезоны 2012–2016 гг. увеличение уровня заболеваемости инфекцией, вызванной RSV, происходило на 2–3 недели позже, чем развитие эпидемии гриппа А. Пик циркуляции вирусов парагриппа наблюдался за 2–3 месяца до сезонных эпидемий гриппа. Росту циркуляции вирусов гриппа А сопутствовало снижение циркуляции риновирусов. Аденовирусы циркулировали в Санкт-Петербурге и Ленинградской области с тенденцией роста заболеваемости до начала сезонных эпидемий гриппа [6].

Эпидемиологическими наблюдениями было установлено, что пики заболеваний, вызванных вирусами гриппа и RSV, не перекрещиваются, хотя и те и другие преобладают зимой [9]. Однако подобные исследования у детей до трех лет, проведенные в Ленинграде в 1965–1967 гг., свидетельствовали, что пики волнообразной заболеваемости, вызванной RSV-инфекцией, лишь слегка опережали пики эпидемий гриппа того периода, вызванных вирусами A(H2N2) и В, хотя все же заболеваемость была на подъеме при совместной циркуляции [5].

### **Активность сезонных респираторных вирусов до и во время пандемии A(H1N1)pdm09**

Пандемия гриппа A(H1N1)pdm09 оказала радикальное влияние на активность сезонных респираторных вирусов [44]. Так, в Сингапуре, стране с экваториальным климатом, наблюдался несезонный характер активности респираторных вирусов в первые месяцы после начала пандемии A(H1N1)pdm09: смещение летнего пика гриппа на сентябрь 2010 г. и самая низкая активность гриппа в июне–июле 2011 г., исчезновение вируса сезонного гриппа A(H1N1) с ноября 2009 г., рост выявления аденовирусов в июне–июле 2011 г., рост выявления вирусов парагриппа в мае–июне 2011 г., отсутствие летнего пика RSV-инфекции в 2009 и 2010 гг. и рост активности RSV зимой 2010 г., который сохранялся до июля 2011 г.

Таким образом, пандемические вирусы гриппа A(H1N1)pdm09, когда они впервые появились, оказали явное влияние на циркуляцию других респираторных вирусов.

Имеются также данные о том, что взаимовлияние вирусов может сказаться на эпидемиологии гриппа. Недавнее исследование показало сильное негативное взаимодействие между вирусом сезонного гриппа А и риновирусом как на популяционном, так и на индивидуальном уровне. Считается даже, что активная циркуляция риновирусов затормозила начавшееся распространение пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 во Франции, Швеции и других европейских странах [18, 41]. Напротив, сопутствующая пандемии гриппа эпидемическая волна RSV в 2009–2010 гг. была такой же, как и в предыдущие сезоны. Показатели обнаружения других респираторных вирусов, а именно метапневмовируса человека, аденовируса или вируса парагриппа и др., на фоне пандемии гриппа были намного ниже [49].

### **Циркуляция сезонных вирусов гриппа до и во время пандемии гриппа A(H1N1)pdm09**

Появление нового пандемического вируса A(H1N1)pdm09 ознаменовалось исчезновением из циркуляции сезонного вируса A(H1N1), а инфекции сезонного гриппа практически не выявлялись (В — 2,0%, A(H3N2) — 0,3%). Вирус A(H1N1)pdm09 утратил доминирующие позиции в зимний период 2010–2011 гг. В это время он повлиял только на частоту инфекций, спровоцированных RSV и вирусом сезонного гриппа, которая снизилась; циркуляция других респираторных патогенов при этом сохранилась. Процент инфицированных аденовирусом и метапневмовирусом увеличился. Из-за отсроченной циркуляции RSV пациенты очень редко были инфицированы более чем одним вирусом [47].

Частота выявления вирусов гриппа в эпидемические сезоны до 2009 г. всегда была значительно ниже, чем RSV. Пандемия 2009 г. суще-

ственно изменила соотношение респираторных вирусов, сделав вирусы гриппа основными респираторными патогенами во всем мире [49]. При этом другие респираторные вирусы продолжали совместную циркуляцию. В Испании, например, помимо вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, у 39,9% пациентов были обнаружены другие респираторные вирусы. Наивысшие показатели выявления отмечались для риновируса и RSV (43,7 и 31,4% положительных образцов соответственно). Совместное инфицирование двумя и более респираторными вирусами наблюдалось примерно в 15% случаев [49].

### **Роль смешанных инфекций в этиологии респираторных заболеваний**

В природе, как правило, одновременно циркулируют несколько респираторных вирусов, соотношение которых в разных климатических зонах и в разные годы может меняться. В регионах с умеренным климатом циркулирующие респираторные вирусы человека подразделяются на три группы в соответствии с их сезонностью [48]. Первая группа — это так называемые зимние вирусы, пик которых наблюдается в холодный период года (вирус гриппа, коронавирусы и RSV). Такие вирусы, как аденовирус, бокавирус, вирус парагриппа, метапневмовирус и риновирус обнаруживаются в течение всего года и составляют вторую группу — группу круглогодичных вирусов. Третья группа — это летние вирусы (представители рода энтеровирусов, не относящиеся к риновирусам).

Сама же инфекция, а именно инфицирование одного хозяина, может быть представлена различными вариантами взаимодействия циркулирующих патогенов [35]. Следует учитывать, что дыхательные пути человека являются своеобразной нишей для различных респираторных патогенов, вступающих в межвидовые взаимодействия [16, 42, 50]. Это может быть 1) единичная инфекция, или моноинфекция (один патоген, один хозяин) [46, 49]; 2) смешанная инфекция (коинфекция), когда два или более антигенно различных патогена заражают одного хозяина [52, 54, 55, 61, 62, 66]; 3) реассортация антигенно родственных вирусов в одном хозяине, инфицированном двумя или более представителями того же типа, например вирусами гриппа А, что приводит к формированию реассортантного потомства; реассортация по сути является следствием одного из вариантов смешанной инфекции [36, 45, 65]. Совместное заражение одного хозяина более чем одним патогеном — достаточно распространенное явление для всех вирусов и встречается в природе чаще, чем можно было бы ожидать [8, 24]. Как правило, смешанные инфекции характеризуются более тяжелым течением, чем моноинфекции.

Примером взаимодействия между вирусами и бактериями является взаимосвязь между вирусом гриппа и пневмококком, приводящая к примерно 100-кратному увеличению восприимчивости человека к пневмококковой пневмонии после инфицирования гриппом [64]. Другой пример — это вирус-вирусные взаимодействия между сезонными вирусами гриппа [51]. Во время сезонного подъема заболеваемости, как правило, циркулируют несколько антигенно различных вирусов гриппа, соотношение которых ежегодно меняется. Например, в 2007–2008 гг. в европейских странах основными этиологическими агентами, вызывавшими эпидемические подъемы, были вирусы гриппа H1N1 и B, а вирусы гриппа H3N2 выявляли в единичных случаях. В то же время в Азии циркулировали все три варианта вируса гриппа — H1N1, H3N2 и B, а в Африке подъем заболеваемости был связан с высокой активностью вирусов гриппа B [2]. В эпидемическом сезоне 2015–2016 гг. среди циркулирующих вирусов гриппа в большинстве стран Северного полушария и России доминировали (более 90%) штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09 [4], а в эпидемическом сезоне 2017–2018 гг. этиологию эпидемических подъемов заболеваемости в России и странах Северного полушария определяли все три вируса гриппа — A(H1N1)pdm09, A(H3N2) и B — циркуляция которых была или одновременной, или последовательной [3].

## Моноинфекции и смешанные респираторные инфекции в пандемию COVID-19

Люди постоянно заражаются различными микроорганизмами, обитающими в дыхательных путях [11]. Особенно опасны смешанные инфекции, которые, как правило, утяжеляют течение заболевания и препятствуют эффективному контролю за респираторными инфекциями. В контексте SARS-CoV-2 во время пандемии COVID-19 люди могут быть коинфицированы 1) вирусом гриппа; 2) вирусом, вызывающим ОРВИ; 3) другими, не респираторными, патогенами (бактериями, грибами и микоплазмами). Каждый из этих вариантов может осложнить течение и лечение COVID-19. Возникает важный вопрос: следует ли в ближайшее время ожидать увеличения или уменьшения числа коинфекций SARS-CoV-2 с другими респираторными патогенами и что происходит сейчас?

Большинство публикаций, описывающих смешанные респираторные инфекции, обязательным компонентом которых является COVID-19, посвящено гриппу и гриппоподобным заболеваниям. По другим инфекциям пока опубликовано всего несколько работ. Так, на данный момент продемонстрирован низкий уровень бактериальных инфекций у пациентов с COVID-19 [13, 38,

61]. Также не установлена связь между тяжестью смешанной инфекции с совместным инфицированием людей вирусами SARS-CoV-2 и цитомегаловирусом [21] или ВИЧ [14]. Поэтому в настоящем обзоре мы ограничились рассмотрением самых распространенных сочетаний: «COVID-19 + грипп» и «COVID-19 + другие ОРВИ».

Как уже упоминалось выше, вирусы пандемического гриппа, и в том числе гриппа A(H1N1)pdm09, вытесняли предшествующие штаммы серотипа A(H1N1) сезонного гриппа [57]; однако циркуляция других респираторных патогенов, таких как риновирус и RSV, оставалась на межпандемическом уровне. Что же происходит сегодня с сезонными респираторными вирусами, включая вирусы гриппа, во время пандемии COVID-19?

### Коинфицирование вирусом SARS-CoV-2 и вирусами гриппа

По данным ВОЗ, по состоянию на 21 декабря 2020 г. глобальная активность гриппа все еще находилась на более низком уровне, чем ожидалось для этого времени года. В умеренных климатических зонах Южного полушария активность гриппа регистрировалась на межсезонном уровне, а в зоне умеренного климата Северного полушария оставалась даже ниже межсезонных уровней [71]. Большинство стран Карибского бассейна и Центральной Америки сообщали в ВОЗ о спорадических обнаружениях гриппа. В тропической части Южной Америки в этот отчетный период грипп не выявлялся. Из тропической Африки, Южной и Юго-Восточной Азии продолжали поступать сообщения об обнаружении гриппа. Во всем мире вирусы гриппа A и B обнаруживаются примерно в одинаковых пропорциях. ВОЗ предупреждает, что представляемые данные эпидемиологического надзора следует интерпретировать с осторожностью из-за возможного влияния активности COVID-19 на приоритеты и возможности тестирования, из-за различных мер гигиены и физического дистанцирования, принимаемых в разных государствах — членах ООН, и т. д. [71].

В начале пандемии COVID-19 в Пекине вирусы гриппа, особенно вирусы гриппа типа A, составляли большую часть респираторных вирусных инфекций [39]. Недавнее исследование показало, что жители Уханя с документально подтвержденной смешанной инфекцией SARS-CoV-2 и гриппа A или B, по-видимому, не имели более тяжелого клинического состояния; они демонстрировали клинические характеристики, аналогичные пациентам с инфекцией SARS-CoV-2 [25].

Существует мнение, что коинфекция SARS-CoV-2 и вируса гриппа встречается редко [55]. В глобальном масштабе по данным из разных стран мира было зарегистрировано ограниченное количество пациентов с коинфекцией «COVID-19 + грипп». Например, исследование, проведенное в Стамбуле (Турция), показало, что

только у 0,54% из 1103 пациентов с COVID-19 были диагностирована коинфекция с вирусом гриппа А или В [55]. Коинфекция вирусом гриппа А была зарегистрирована в США, Турции, Германии, Иране, Китае, Японии и Испании [10, 25, 27, 32, 37, 52, 55, 68, 72, 73, 74]; коинфекция вирусом гриппа В была зарегистрирована в Турции, Китае и Испании [20, 25, 55]; одновременная инфекция гриппа А, В и COVID-19 была выявлена в Китае и Испании [20, 73].

В любой ситуации меры по обеспечению готовности к гриппу играют решающую роль, особенно для групп высокого риска, и уровень охвата вакцинацией против гриппа должен составлять не менее 70% [53]. Меры против COVID-19 могут снизить количество случаев заражения гриппом. Пик сезонных случаев гриппа в Северном полушарии обычно приходится на февраль и заканчивается к концу мая. Необычно то, что в 2020 г. количество лабораторно подтвержденных случаев гриппа резко снизилось в начале апреля, вскоре после того, как ВОЗ объявила пандемию COVID-19. Была выдвинута гипотеза о том, что сезон гриппа был прерван и что заболеваемость гриппом была существенно снижена за счет жестких мер контроля, направленных на предотвращение передачи SARS-CoV-2 [29].

На пресс-конференции ВОЗ 15 июня 2020 г. Генеральный директор ВОЗ доктор Тедрос А. Гебрейесус сказал: «Несмотря на продолжающиеся глобальные ответные меры на пандемию COVID-19, мы не можем упускать из виду другие важные проблемы общественного здравоохранения, включая грипп. Грипп поражает каждую страну каждый год и уносит жизни. Вступая в сезон гриппа в Южном полушарии и приступая к планированию сезона в Северном полушарии, мы должны сделать так, чтобы грипп оставался главным приоритетом» [70]. Доктор Гебрейесус далее отметил, что сегодня по всему миру мы сталкиваемся с резким сокращением количества образцов, протестированных на грипп. Эти нарушения могут иметь краткосрочные и долгосрочные последствия, такие как упущение возможности обнаруживать новые вирусы гриппа с пандемическим потенциалом и оперативно сообщать о них в ВОЗ.

Таким образом, COVID-19 может значительно влиять на численность инфекций, вызываемых другими респираторными вирусами, включая вирусы гриппа. Однако трудно отличить прямое влияние COVID-19 на сокращение числа респираторных инфекций от ее опосредованного воздействия из-за снижения эффективности эпидемиологического надзора за гриппом.

#### **Коинфицирование вирусом SARS-CoV-2 и сезонными респираторными вирусами негриппозной этиологии**

Помимо вирусов гриппа, другие респираторные вирусы также играют важную роль в эпи-

демиологическом процессе. Недавно установленный разный уровень смешанных инфекций с SARS-CoV-2 [38] позволяет предполагать, что пандемия COVID-19, вероятно, будет развиваться по одному из представленных на рисунке сценариев: вирусы SARS-CoV-2 1) будут циркулировать с другими респираторными вирусами или 2) вытеснят их.

В отличие от показателей коинфекции вирусами гриппа и SARS-CoV-2, которые продемонстрировали некоторое снижение активности, уровень смешанных инфекций SARS-CoV-2 с другими респираторными патогенами оказался выше, чем ожидалось [63]. Так, исследование, проведенное в Калифорнии, показало, что среди пациентов с подтвержденной COVID-19 инфекцией у 20,7% обнаруживались один или несколько других патогенов; наиболее распространенными были риновирус, энтеровирус, RSV и сезонный коронавирус [33]. В исследовании, проведенном в Китае, 14 из 32 положительных на COVID-19 пациентов были инфицированы другими патогенами, включая вирусы, бактерии и грибы, причем четверо из них были инфицированы респираторными вирусами — RSV, вирусом парагриппа человека, риновирусом и метапневмовирусом человека [40].

Считается, что коинфекция двумя респираторными вирусами редко встречается у взрослых и в основном присуща детям [66]. В феврале 2020 г., в самом начале распространения COVID-19 в Японии, дети сравнительно редко болели этой инфекцией; у них преобладали вирус гриппа и метапневмовирус человека (исследование проводилось в районе Фурано). На момент исследования только у троих детей был диагностирован COVID-19, двое из них были одновременно инфицированы вирусом гриппа и метапневмовирусом человека [30]. Смешанная инфекция метапневмовируса и SARS-CoV-2 была обнаружена и у взрослого пациента в Провиденсе (Род-Айленд, США) [66].

Подробное исследование распространенности респираторных вирусных инфекций, включая COVID-19, с декабря 2019 г. по март 2020 г. было проведено в Италии Calderaro A. и соавт. [17]. Из 906 образцов из дыхательных путей пациентов госпиталя в Парме 52,3% были положительными как минимум в отношении одного вируса. При этом моноинфекции были выявлены в 80,2% положительных проб, смешанные — в 19,8%. RSV (23,7%) и риновирус (22,3%) были наиболее часто идентифицируемыми вирусами, за ними следовал SARS-CoV-2 (14,1%). RSV преобладал в циркуляции до февраля 2020 г., после чего его выявление резко сократилось до 1,5%. SARS-CoV-2 отсутствовал в исследуемой области до конца февраля 2020 г., а затем чуть более чем за месяц превысил уровень в 14%; все случаи представляли собой моноинфекцию. Было обнаружено только три случая смешанных с SARS-

CoV-2 респираторных инфекций, причем все они наблюдались у детей младше одного года. Интересно, что сезонные вирусы в основном поражали детей без каких-либо различий по полу, тогда как SARS-CoV-2 в основном поражал взрослых мужчин [17].

В целом в мире среди сопутствующих вирусу SARS-CoV-2 возбудителей преобладали RSV и риновирус. Именно эти вирусы являются наиболее частыми причинами острых респираторных инфекций, особенно тяжелых заболеваний у детей раннего возраста и пожилых людей, и могут привести к тяжелым острым инфекциям нижних дыхательных путей, бронхолииту, пневмонии и обострениям астмы [30, 40]. Постинфекционный иммунитет непродолжителен, что приводит к повторной циркуляции вирусов в одной и той же популяции. Совместное инфицирование такими сезонными патогенами, наряду с вирусами гриппа, с новым пандемическим вирусом SARS-CoV-2 может усугубить течение болезни и представляет собой серьезную проблему для диагностики и лечения.

## Заключение

Когда мы сталкиваемся с быстро распространяющимся в человеческой популяции новым вирусом, база имеющихся о нем знаний очень ограничена. Появление в 2019 г., а затем пандемическое распространение нового коронавируса SARS-CoV-2 предоставило ученым уникальную

возможность больше узнать о патогенезе других возбудителей респираторных инфекций в условиях циркуляции пандемических вирусов.

В мире накоплен большой массив знаний о предыдущих пандемиях гриппа, которые имеют много общего с пандемией COVID-19 [15, 26]. В частности, было установлено, что пандемические вирусы, в том числе A(H1N1)pdm09 и SARS-CoV-2, вытесняют штаммы сезонного гриппа и некоторых респираторных вирусов негриппозной этиологии [17, 57]; однако циркуляция других респираторных патогенов, таких как риновирус и RSV, остается практически на межпандемическом уровне. Это свидетельствует о том, что не стоит недооценивать роль риновирусов и RSV в общей структуре респираторной заболеваемости.

Ozawa M. и Kawaoka Y. [56] убеждены в том, что полный контроль над вирусами гриппа невозможен [34]. Не стоит рассчитывать на то, что в ближайшее время произойдет полное искоренение гриппа. Это применимо и к пандемии COVID-19. На сегодняшний день она еще далека от завершения, и мы, как и с гриппом, далеки от победы над ней и находимся в самом начале долгого и тернистого пути. Весьма вероятно, что после SARS-CoV-2 будет еще одна пандемия, вызванная другим коронавирусом, вирусом гриппа, парамиксовирусом или совершенно новым патогеном [60]. Грамотный и всесторонний анализ текущей ситуации с COVID-19 позволит противостоять угрозе будущей пандемии.

## Список литературы/References

1. Базан О.И. Патологоанатомическая служба в блокадном Ленинграде. Научный анализ, личные воспоминания. СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2006. 134 с. [Bazan O.I. Pathological service in besieged Leningrad. Scientific analysis, personal memories. *St. Petersburg: ELBI-SPb, 2006. 134 p. (In Russ.)*]
2. Беляев А.Л., Феодоритова Е.Л., Слепушкин А.Н. Итоги эпидсезона 2007–2008 гг. по гриппу и другим ОРВИ и профилактика этих инфекций // Пест-Менеджмент. 2008. № 3. С. 26–31. [Belyaev A.L., Feodoritova E.L., Slepushkin A.N. 2008. Summary of influenza and ARD 2007–2008 epidemic season and these infections' prophylaxis. *Pest-Management, 2008, no. 3, pp. 26–31. (In Russ.)*]
3. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Мукашева Е.А., Колобухина Л.В., Трушакова С.В., Бреслав Н.В., Феодоритова Е.Л., Меркулова Л.Н., Краснослободцев К.Г., Морозова Е.О., Федакина И.Т., Аристова В.А., Вартамян Р.В., Кистенева Л.Б., Прилипов А.Г., Альховский С.В., Росаткевич А.Г., Кружкова И.С., Беляев А.Л., Аксельрод Э.В., Базарова М.В., Сметанина С.В. Активность вирусов гриппа в сезон 2017–2018 гг. в России и странах Северного полушария: конфликт по В-вирусному компоненту вакцин // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018. Т. 19, № 3. С. 13–21. [Lvov D.K., Burtseva E.I., Mukasheva E.A., Kolobukhina L.V., Trushakova S.V., Breslav N.V., Feodoritova E.L., Merkulova L.N., Krasnoslobodtsev K.G., Morozova E.O., Fedyakina I.T., Aristova V.A., Vartanyan R.V., Kisteneva L.B., Prilipov A.G., Alkhovskiy S.V., Rosatkevich A.G., Kruzhkova I.S., Belyaev A.L., Axelrod E.V., Bazarova M.V., Smetanina S.V. The activity of influenza viruses during 2017–2018 season in Russia and countries of the Northern Hemisphere: conflict by the B-virus vaccine component. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention, 2018, vol. 19, no. 3, pp. 13–21. (In Russ.)* doi: 10.31631/2073-3046-2019-18-3-13-21]
4. Львов Д.К., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И., Кружкова И.С., Малышев Н.А., Федакина И.Т., Кириллова Е.С., Трушакова С.В., Феодоритова Е.Л., Меркулова Л.Н., Краснослободцев К.Г., Мукашева Е.А., Гарина Е.О., Вартамян Р.В., Кистенева Л.Б., Прилипов А.Г., Базарова М.В., Десяткин А.В., Суточникова О.А. Эпидемический сезон 2015–2016 гг. в России и мире: особенности циркуляции вирусов гриппа, динамика заболеваемости, клинические аспекты и алгоритм лечения // Терапевтический архив. 2016. Т. 88, № 11. С. 112–120. [Lvov D.K., Kolobukhina L.V., Burtseva E.I., Kruzhkova I.S., Malyshev N.A., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Trushakova S.V., Feodoritova E.L., Merkulova L.N., Krasnoslobodtsev K.G., Mukasheva E.A., Garina E.O., Vartanyan R.V., Kisteneva L.B., Prilipov A.G., Bazarova M.V., Devyatkin A.V., Sutochnikova O.A. The 2015–2016 epidemic season in Russia and the world: circulation of influenza viruses, trends in incidence, clinical aspects, and treatment algorithm. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive, 2016, vol. 88, no. 11, pp. 112–120. (In Russ.)* doi: 10.17116/terarkh20168811112-120]

5. Морозенко М.А., Микуцкая Б.А., Сиротенко Е.А., Тимофеева Г.А., Смородинцев А.А. Удельный вес респираторно-синцитиальной инфекции в межэпидемические по гриппу периоды в Ленинграде. В кн.: Проблемы этиологии, диагностики, профилактики и клиники респираторных вирусных инфекций. Л., 1969. С. 417–424. [Morozenko M.A., Mikutskaya B.A., Sirotenko E.A., Timofeeva G.A., Smorodintsev A.A. The proportion of respiratory syncytial infection during interepidemic periods of influenza in Leningrad. In: Problems of Etiology, Diagnosis, Prevention and Clinical Picture of Respiratory Viral Infections. Leningrad, 1969, pp. 417–424. (In Russ.)]
6. Писарева М.М., Едер В.А., Бузицкая Ж.В., Мусаева Т.Д., Афанасьева В.С., Го А.А., Образцова Е.А., Суховецкая В.Ф., Комиссаров А.Б. Этиологическая структура гриппа и других ОРВИ в Санкт-Петербурге в эпидемические сезоны 2012–2016 гг. // Вопросы вирусологии. 2018. Т. 63, № 5. С. 233–239. [Pisareva M.M., Eder V.A., Buzitskaya Zh.V., Musaeva T.D., Afanaseva V.S., Go A.A., Obraztsova E.A., Sukhovetskaya V.F., Komissarov A.B. Etiological structure of influenza and other ARVI in St. Petersburg during epidemic seasons 2012–2016. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2018, vol. 63, no. 5, pp. 233–239. (In Russ.)] doi: 10.18821/0507-4088-2018-63-5-233-239
7. Akin L., Gözel M.G. Understanding dynamics of pandemics. *Turk. J. Med. Sci.*, 2020, vol. 50, no. SI–1, pp. 515–519. doi: 10.3906/sag-2004-133
8. Alcaide C., Rabadan M.P., Moreno-Perez M.G., Gomez P. Implications of mixed viral infections on plant disease ecology and evolution. *Adv. Virus Res.*, 2020, vol. 106, pp. 145–169. doi: 10.1016/bs.aivir.2020.02.001
9. Ånestad G. Interference between outbreaks of respiratory syncytial virus and influenza virus infection. *Lancet*, 1982, vol. 1, no. 8270, p. 502. doi: 10.1016/S0140-6736(82)91466-0
10. Azekawa S., Namkoong H., Mitamura K., Kawaoka Y., Saito F. Co-infection with SARS-CoV-2 and influenza A virus. *IDCases*, 2020, vol. 20: e00775. doi: 10.1016/j.idcr.2020.e00775
11. Babiuk L.A., Lawman M.J., Ohmann H.B. Viral-bacterial synergistic interaction in respiratory disease. *Adv. Virus Res.*, 1988, vol. 35, pp. 219–249. doi: 10.1016/S0065-3527(08)60713-7
12. Belser J.A. Assessment of SARS-CoV-2 replication in the context of other respiratory viruses. *Lancet Respir. Med.*, 2020, vol. 8, no. 7, pp. 651–652. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30227-7
13. Bengoechea J.A., Bamford C.G.G. SARS-CoV-2, bacterial co-infections, and AMR: the deadly trio in COVID-19? *EMBO Mol. Med.*, 2020, vol. 12, no. 7: e12560. doi: 10.15252/emmm.202012560
14. Benkovic S., Kim M., Sin E. Four cases: HIV and SARS-CoV-2 coinfection in patients from Long Island, New York. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 11, pp. 2338–2340. doi: 10.1002/jmv.26029
15. Bogaert D., Dockrell D.H. 100 years of influenza research seen through the lens of COVID-19. *Mucosal Immunol.*, 2020, vol. 13, no. 4, pp. 561–562. doi: 10.1038/s41385-020-0291-9
16. Bosch A.A., Biesbroek G., Trzcinski K., Sanders E.A., Bogaert D. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathog.*, 2013, vol. 9, no. 1: e1003057. doi: 10.1371/journal.ppat.1003057
17. Calderaro A., De Conto F., Buttrini M., Piccolo G., Montecchin S., Maccari C., Martinelli M., Di Maio A., Ferraglia F., Pinardi F., Montagna P., Arcangeletti M.C., Chezzi C. Human respiratory viruses, including SARS-CoV-2, circulating in the winter season 2019–2020 in Parma, Northern Italy. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 102, pp. 79–84. doi: 10.1016/j.ijid.2020.09.1473
18. Casalegno J.S., Ottmann M., Duchamp M.B., Escuret V., Billaud G., Frobert E., Morfin F., Lina B. Rhinoviruses delayed the circulation of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in France. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2010, vol. 16, no. 4, pp. 326–329. doi: 10.1111/j.14690691.2010.03167.x
19. Coughlin S.S. Anxiety and depression: linkages with viral diseases. *Public Health Rev.*, 2012, vol. 34, no. 2, 17 p. doi: 10.1007/BF03391675
20. Cuadrado-Payán E., Montagud-Marrahi E., Torres-Elorza M., Bodro M., Blasco M., Poch E., Soriano A., Piñeiro G.J. SARS-CoV-2 and influenza virus coinfection. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10236: e84. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31052-7
21. D'Ardes D., Boccatonda A., Schiavone C., Santilli F., Guagnano M.T., Bucci M., Cipollone F. A case of coinfection with SARS-CoV-2 and cytomegalovirus in the era of COVID-19. *Eur. J. Case Rep. Intern. Med.*, 2020, vol. 7, no. 5: 001652. doi: 10.12890/2020\_001652
22. Dawood F.S., Iuliano A.D., Reed C., Meltzer M.I., Shay D.K., Cheng P.Y., Bandaranayake D., Breiman R.F., Brooks W.A., Buchy P., Feikin D.R., Fowler K.B., Gordon A., Hien N.T., Horby P., Huang Q.S., Katz M.A., Krishnan A., Lal R., Montgomery J.M., Mølbak K., Pebody R., Presanis A.M., Razuri H., Steens A., Tinoco Y.O., Wallinga J., Yu H., Vong S., Bresee J., Widdowson M.A. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect. Dis.*, 2012, vol. 12, no. 9, pp. 687–695. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70121-4
23. Dhabhar F.S., Malarkey W.B., Neri E., McEwen B.S. Stress-induced redistribution of immune cells — from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones — Curt Richter Award winner. *Psychoneuroendocrinology*, 2012, vol. 37, no. 9, pp. 1345–1368. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.05.008
24. Diaz-Munoz S.L. Viral coinfection is shaped by host ecology and virus–virus interactions across diverse microbial taxa and environments. *Virus Evol.*, 2017, vol. 3, no. 1: vex011. doi: 10.1093/ve/vex011
25. Ding Q., Lu P., Fan Y., Xia Y., Liu M. The clinical characteristics of pneumonia patients coinfecting with 2019 novel coronavirus and influenza virus in Wuhan, China. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 9, pp. 1549–1555. doi: 10.1002/jmv.25781
26. Dunning J., Thwaites R.S., Openshaw P.J.M. Seasonal and pandemic influenza: 100 years of progress, still much to learn. *Mucosal Immunol.*, 2020, vol. 13, no. 4, pp. 566–573. doi: 10.1038/s41385-020-0287-5
27. Hashemi S.A., Safamanesh S., Ghafouri M., Taghavi M.R., Mohajer Zadeh Heydari M.S., Namdar Ahmadabad H., Ghasem Zadeh-Moghaddam H., Azimian A. Coinfection with COVID-19 and influenza A virus in two died patients with acute respiratory syndrome, Bojnurd, Iran. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 11, pp. 2319–2321. doi: 10.1002/jmv.26014
28. Johnson N.P., Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918–1920 “Spanish” influenza pandemic. *Bull. Hist. Med.*, 2002, vol. 76, no. 1, pp. 105–115. doi: 10.1353/bhm.2002.0022
29. Jones N. How coronavirus lockdowns stopped flu in its tracks. Nature news. 21 May 2020. URL: <https://www.nature.com/articles/d41586-020-01538-8>

30. Kakuya F., Okubo H., Fujiyasu H., Wakabayashi I., Syouji M., Kinebuchi T. The first pediatric patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Japan: risk of coinfection with other respiratory viruses. *Jpn J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 73, no. 5, pp. 377–380. doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.181
31. Khaitov M.R., Laza-Stanca V., Edwards M.R., Walton R.P., Rohde G., Contoli M., Papi A., Stanciu L.A., Kolenko S.V., Johnston S.L. Respiratory virus induction of alpha-, beta- and lambda-interferons in bronchial epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells. *Allergy*, 2009, vol. 64, no. 3, pp. 375–386. doi: 10.1111/j.1398-9995.2008.01826.x
32. Khodamoradi Z., Moghadami M., Lotfi M. Coinfection of coronavirus disease 2019 and influenza A: a report from Iran. *Arch. Iran Med.*, 2020, vol. 23, no. 4, pp. 239–243. doi: 10.34172/aim.2020.04
33. Kim D., Quinn J., Pinsky B., Shah N.H., Brown I. Rates of coinfection between SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens. *Jama*, 2020, vol. 323, no. 20, pp. 2085–2086. doi: 10.1001/jama.2020.6266
34. Kiseleva I. Will we ever be able to defeat human influenza? *Open Microbiol. J.*, 2019, vol. 13, pp. 313–314. doi: 10.2174/1874285801913010313
35. Kiseleva I., Grigorieva E., Larionova N., Al Farroukh M., Rudenko L. COVID-19 in light of seasonal respiratory infections. *Biology (Basel)*, 2020, vol. 9, no. 9, p. 240. doi: 10.3390/biology9090240
36. Klempa B. Reassortment events in the evolution of hantaviruses. *Virus Genes*, 2018, vol. 54, no. 5, pp. 638–646. doi: 10.1007/s11262-018-1590-z
37. Konala V.M., Adap S., Gaya V., Naramal S., Daggubati S.R., Kammar C.B., Chenn A. Coinfection with influenza A and COVID-19. *Eur. J. Case Rep. Intern. Med.*, 2020, vol. 7, no. 5: 001656. doi: 10.12890/2020\_001656
38. Lansbury L., Lim B., Baskaran V., Lim W.S. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect.*, 2020, vol. 81, no. 2, pp. 266–275. doi: 10.1016/j.jinf.2020.05.046
39. Li Y., Wang J., Wang C., Yang Q., Xu Y., Xu J., Li Y., Yu X., Zhu H., Liu J. Characteristics of respiratory virus infection during the outbreak of 2019 novel coronavirus in Beijing. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 96, pp. 266–269. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.008
40. Li Z.T., Chen Z.M., Chen L.D., Zhan Y.Q., Li S.Q., Cheng J., Zhu A.R., Chen L.Y., Zhong N.S., Li S.Y., Lu W.J., Ye F. Coinfection with SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens in COVID-19 patients in Guangzhou, China. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 11, pp. 2381–2383. doi: 10.1002/jmv.26073
41. Linde A., Rotzén-Ostlund M., Zweyberg-Wirgart B., Rubinova S., Brytting M. Does viral interference affect spread of influenza? *Euro Surveill.*, 2009, vol. 14, no. 40: 19354. doi: 10.2807/ese.14.40.19354-en
42. Lloyd-Smith J.O. Vacated niches, competitive release and the community ecology of pathogen eradication. *Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2013, vol. 368, no. 1623: 20120150. doi: 10.1098/rstb.2012.0150
43. Lowen A.C., Mubareka S., Tumpey T.M., Garcia-Sastre A., Palese P. The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, no. 26, pp. 9988–9992. doi: 10.1073/pnas.0604157103
44. Mak G.C., Wong A.H., Ho W.Y., Lim W. The impact of pandemic influenza A (H1N1) 2009 on the circulation of respiratory viruses 2009–2011. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2012, vol. 6, no. 3: e6–10. doi: 10.1111/j.1750-2659.2011.00323.x
45. Matsuzaki Y., Sugawara K., Takashita E., Muraki Y., Hongo S., Katsushima N., Mizuta K., Nishimura H. Genetic diversity of influenza B virus: the frequent reassortment and cocirculation of the genetically distinct reassortant viruses in a community. *J. Med. Virol.*, 2004, vol. 74, no. 1, pp. 132–140. doi: 10.1002/jmv.20156
46. Maurice J.B., Patel A., Scott A.J., Patel K., Thursz M., Lemoine M. Prevalence and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease in HIV-monoinfection. *AIDS*, 2017, vol. 31, no. 11, pp. 1621–1632. doi: 10.1097/QAD.0000000000001504
47. Meningher T., Hindiyeh M., Regev L., Sherbany H., Mendelson E., Mandelboim M. Relationships between A(H1N1)pdm09 influenza infection and infections with other respiratory viruses. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2014, vol. 8, no. 4, pp. 422–430. doi: 10.1111/irv.12249
48. Moriyama M., Hugentobler W.J., Iwasaki A. Seasonality of respiratory viral infections. *Annu. Rev. Virol.*, 2020, vol. 7, no. 1, pp. 83–101. doi: 10.1146/annurev-virology-012420-022445
49. Navarro-Mari J.M., Pérez-Ruiz M., Galán Montemayor J.C., Marcos Maeso M., Reina J., de Oña Navarro M., Cilla Eguiluz C.G. Circulation of other respiratory viruses and viral coinfection during the 2009 pandemic influenza. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.*, 2012, vol. 30, no. 4, pp. 25–31. doi: 10.1016/S0213-005X(12)70101-5
50. Nickbakhsh S., Ho A., Marques D.F.P., McMenamin J., Gunson R.N., Murcia P.R. Epidemiology of seasonal coronaviruses: Establishing the context for COVID-19 emergence. *J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 222, no. 1, pp. 17–25. doi: 10.1093/infdis/jiaa185
51. Nickbakhsh S., Mair C., Matthews L., Reeve R., Johnson P.C.D., Thorburn F., von Wissmann B., Reynolds A., McMenamin J., Gunson R.N., Murcia P.R. Virus–virus interactions impact the population dynamics of influenza and the common cold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2019, vol. 116, no. 52, pp. 27142–27150. doi: 10.1073/pnas.1911083116
52. Nowak M.D., Sordillo E.M., Gitman M.R., Paniz Mondolfi A.E. Coinfection in SARS-CoV-2 infected patients: where are influenza virus and rhinovirus/enterovirus? *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 10, pp. 1699–1700. doi: 10.1002/jmv.25953
53. Osterhaus A.D.M.E. Influenza and RSV in a COVID-19 world. The first ESWI webinar 11 June 2020. URL: <https://eswi.org/eswi-tv/influenza-and-rsv-in-a-covid-19-world-full-webinar>
54. Ou X., Zhou L., Huang H., Lin Y., Pan X., Chen D. A severe case with coinfection of SARS-CoV-2 and common respiratory pathogens. *Trav. Med. Infect. Dis.*, 2020, vol. 36: 101672. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101672
55. Ozaras R., Cirpin R., Duran A., Duman H., Arslan O., Bakcan Y., Kaya M., Mutlu H., Isayeva L., Kebanli F., Deger B.A., Bekeshev E., Kaya F., Bilir S. Influenza and COVID-19 coinfection: report of 6 cases and review of the literature. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 11, pp. 2657–2665. doi: 10.1002/jmv.26125
56. Ozawa M., Kawaoka Y. Cross talk between animal and human influenza viruses. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 2013, vol. 1, pp. 21–42. doi: 10.1146/annurev-animal-031412-103733
57. Palese P., Wang T.T. Why do influenza virus subtypes die out? A hypothesis. *mBio*, 2011, vol. 2, no. 5: e00150-11. doi: 10.1128/mBio.00150-11
58. Pascalis H., Temmam S., Turpin M., Rollot O., Flahault A., Carrat F., de Lamballerie X., Gérardin P., Dellagi K. Intense co-circulation of non-influenza respiratory viruses during the first wave of pandemic influenza pH1N1/2009: a cohort study in Reunion Island. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 9: e44755. doi: 10.1371/journal.pone.0044755

59. Pennington H. The impact of infectious disease in war time: a look back at WW1. *Fut. Micr.*, 2019, vol. 14, pp. 165–168. doi: 10.2217/fmb-2018-0323
60. Petersen E., Koopmans M., Go U., Hamer D.H., Petrosillo N., Castelli F., Storgaard M., Al Khalili S., Simonsen L. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 9, pp. e238–e244. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30484-9
61. Rawson T.M., Moore L.S.P., Zhu N., Ranganathan N., Skolimowska K., Gilchrist M., Satta G., Cooke G., Holmes A. Bacterial and fungal coinfection in individuals with coronavirus: a rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 71, no. 9, pp. 2459–2468. doi: 10.1093/cid/ciaa530
62. Rodriguez J.A., Rubio-Gomez H., Roa A.A., Miller N., Eckardt P.A. Coinfection with SARS-CoV-2 and parainfluenza in a young adult patient with pneumonia: case report. *IDCases*, 2020, vol. 20: e00762. doi: 10.1016/j.idcr.2020.e00762
63. Sánchez-Duque J.A., Orozco-Hernández J.P., Marín-Medina D.S., Cvetkovic-Vega A., Aveiro-Róbaló T.R., Mondragon-Cardona A., Failoc-Rojas V.E., Gutiérrez-Ocampo E., Villamizar-Peña R., Henao-Martínez J.F., Arteaga-Livias K., Rodríguez-Morales A.J. Are we now observing an increasing number of coinfections between SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens? *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 11, pp. 2398–2400. doi: 10.1002/jmv.26089
64. Shrestha S., Foxman B., Weinberger D.M., Steiner C., Viboud C., Rohani P. Identifying the interaction between influenza and pneumococcal pneumonia using incidence data. *Sci. Transl. Med.*, 2013, vol. 5, no. 191: 191ra184. doi: 10.1126/scitranslmed.3005982
65. Steel J., Lowen A.C. Influenza A virus reassortment. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2014, vol. 385, pp. 377–401. doi: 10.1007/82\_2014\_395
66. Touzard-Romo F., Tapé C., Lonks J.R. Co-infection with SARS-CoV-2 and human metapneumovirus. *R. I. Med. J. (2013)*, 2020, vol. 103, no. 2, pp. 75–76.
67. Viboud C., Simonsen L., Fuentes R., Flores J., Miller M.A., Chowell G. Global mortality impact of the 1957–1959 influenza pandemic. *J. Infect. Dis.*, 2016, vol. 213, no. 5, pp. 738–745. doi: 10.1093/infdis/jiv534
68. Wehl G., Laible M., Rauchenzauner M. Co-infection of SARS-CoV-2 and influenza A in a pediatric patient in Germany. *Klin. Pediatr.*, 2020, vol. 232, no. 4, pp. 217–218. doi: 10.1055/a-1163-7385
69. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) dashboard. 2020. URL: <https://covid19.who.int>
70. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. Press Conference of 15 June 2020. URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
71. WHO. Overview of influenza activity globally. Influenza Update No. 383 of 21 December 2020. URL: [https://www.who.int/influenza/surveillance\\_monitoring/updates/latest\\_update\\_GIP\\_surveillance/en](https://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en)
72. Wu D., Lu J., Ma X., Liu Q., Wang D., Gu Y., Li Y., He W. Coinfection of influenza virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2020, vol. 39, no. 6: e79. doi: 10.1097/INF.0000000000002688
73. Wu Q., Xing Y., Shi L., Li W., Gao Y., Pan S., Wang Y., Wang W., Xing Q. Coinfection and other clinical characteristics of COVID-19 in children. *Pediatrics*, 2020, vol. 146, no. 1: e20200961. doi: 10.1542/peds.2020-0961
74. Wu X., Cai Y., Huang X., Yu X., Zhao L., Wang F., Li Q., Gu S., Xu T., Li Y., Lu B., Zhan Q. Co-infection with SARS-CoV-2 and influenza A virus in patient with pneumonia, China. *Emerg. Infect. Dis.*, 2020, vol. 26, no. 6, pp. 1324–1326. doi: 10.3201/eid2606.200299

**Авторы:**

**Киселева И.В.**, д.б.н., профессор, зав. лабораторией общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

**Ларионова Н.В.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

**Григорьева Е.П.**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

**Ксенафонтов А.Д.**, аспирант ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

**Аль Фаррух М.**, аспирант ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

**Руденко Л.Г.**, д.м.н., профессор, зав. отделом вирусологии им. А.А.Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Kiseleva I.V.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Larionova N.V.**, PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

**Grigorieva E.P.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

**Ksenafontov A.D.**, PhD Student, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

**Al Farroukh M.**, PhD Student, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

**Rudenko L.G.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

# GENDER-RELATED RESPONSE OF BODY SYSTEMS IN COVID-19 AFFECTS OUTCOME

M. Khaksari<sup>a</sup>, N. Sabet<sup>a</sup>, Z. Soltani<sup>a</sup>, H. Bashiri<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

<sup>b</sup> Sirjan University of Medical Sciences, Sirjan, Iran

**Abstract.** Severe acute respiratory syndrome (SARS)-like coronavirus (SARS-CoV-2) is the seventh member of the coronaviruses (CoVs) family that infects humans and causes coronavirus disease 2019 (COVID-19), which is currently a global pandemic. Widespread secretion of cytokines has been shown to occur early in severe cases of the disease and can be an effective factor in the rapid progression of the disease. Systemic inflammation indicates an advanced stage of acute disease, which is characterized by multiple organ failure and elevated key inflammatory markers. Studies have shown a gender difference between the incidence and mortality of COVID-19. In this review, we investigated the gender difference in the systemic effects of COVID-19 and found that this gender difference exists especially in the respiratory, cardiovascular, liver, gastrointestinal and kidney systems. Due to the worse outcome of COVID in males, the role of female sex hormones in causing these gender differences is noticeable. There can be a systemic and local effect of female sex hormones, especially estrogen and possibly progesterone, on various cells. Among the effects of these hormones is the regulation of localized angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) levels. ACE2 is the route of entry for SARS-CoV-2 virus into the cell. It is hoped that this review would address gender differences for better management of COVID-19 treatment.

**Key words:** COVID-19, gender difference, inflammation, angiotensin-converting enzyme 2, estrogen, progesterone.

## ПОЛ ПАЦИЕНТА ВЛИЯЕТ НА ОТВЕТ СИСТЕМ ОРГАНИЗМА И КЛИНИЧЕСКИЙ ИСХОД ПРИ COVID-19

Хаксари М.<sup>1</sup>, Сабет Н.<sup>1</sup>, Солтани З.<sup>1</sup>, Башири Х.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Керманский университет медицинских наук, г. Керман, Иран

<sup>2</sup> Сирджанский университет медицинских наук, г. Сирджан, Иран

**Резюме.** Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) является седьмым представителем семейства коронавирусов (CoV), патогенным для человека, и возбудителем коронавирусного инфекционного заболевания (COVID-19), достигшего к настоящему времени масштаба глобальной пандемии. Было показано, что на ранней стадии тяжелых случаев заболевания секретируется значительный объем цитокинов. Это может стать важным фактором быстрого прогрессирования заболевания. Системное воспаление указывает на запущенную стадию острого заболевания, которая характеризуется полиорганной недостаточностью и повышенным уровнем ключевых воспалительных маркеров. Ранее проведенные исследования продемонстрировали гендерные различия в уровне заболеваемости и смертности от COVID-19. В данном обзоре мы исследовали гендерные различия в системных эффектах COVID-19 и обнаружили, что подобные различия наиболее выражены в дыхательной, сердечно-сосудистой системах, желудочно-кишечном тракте, печени и почках. На основании регистрации худшего исхода COVID-19 у мужчин высказано предположение о возможном влиянии женских половых гормонов на течение болезни. Женские половые гормоны, особенно эстроген и, возможно, прогестерон, могут оказывать системное и местное действие на различные типы клеток, а также регулировать локальные уровни ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2). Установлено, что вирус SARS-CoV-2 проникает в клетку через ACE2. Мы полагаем, что рассмотренные в настоящем обзоре гендерные различия позволят улучшить ведение пациентов с COVID-19.

**Ключевые слова:** COVID-19, гендерные различия, воспаление, ангиотензинпревращающий фермент 2, эстроген, прогестерон.

### Адрес для переписки:

Захра Солтани  
Иран, г. Керман, Керманский университет медицинских наук.  
Тел./факс: +98 3433257581.  
E-mail: z.soltani@kmu.ac.ir, soltaniy@yahoo.com

### Contacts:

Zahra Soltani  
Iran, Kerman, Kerman University of Medical Sciences.  
Phone/fax: +98 3433257581.  
E-mail: z.soltani@kmu.ac.ir, soltaniy@yahoo.com

### Для цитирования:

Хаксари М., Сабет Н., Солтани З., Башири Х. Пол пациента влияет на ответ систем организма и клинический исход при COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1020–1036.  
doi: 10.15789/2220-7619-GRR-1664

### Citation:

Khaksari M., Sabet N., Soltani Z., Bashiri H. Gender-related response of body systems in COVID-19 affects outcome // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1020–1036.  
doi: 10.15789/2220-7619-GRR-1664

© Khaksari M. et al., 2021

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-GRR-1664>

## Gender-related response of body systems in COVID-19 affects outcome

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is currently a global pandemic that has affected approximately 212 countries worldwide and has so far claimed the lives of more than 931 321 people in the world. Currently there are approximately 29 444 198 confirmed cases of COVID-19 in the world [28, 152]. The COVID-19 first originated in Wuhan, China in December 2019, and scientists around the world are working to understand this virus and its properties in order to design interventional strategies to combat the disease. COVID-19 is caused by a virus called severe acute respiratory syndrome (SARS)-like coronavirus (SARS-CoV-2), which is a single-stranded RNA (ssRNA) virus with genome size of 29 903 bp. The SARS-CoV-2 belongs to the same beta-coronavirus that were previously reported as SARS-CoV and middle east respiratory syndromecoronavirus (MERS-CoV). They are not only sequentially similar, but the point of entry to human for both is through the same receptor [3, 55]. SARS-CoV-2 is the seventh member of the coronaviruses (CoVs) family that infects humans and causes COVID-19 [153].

Human CoVs (HCoVs) have neuronal invasive capacities and may act through two main mechanisms [12, 30, 31]: virus replication within glial or neuronal cells of the brain, or an autoimmune reaction with the host's inadequate immune response [79]. In relation to COVID-19, data on central nervous system (CNS) involvement are unusual but growing, which indicate a high frequency of neurological symptoms [99, 112, 115]. Coronaviruses can cause nerve damage through direct infection pathways (circulatory and nerve pathways), hypoxia, immune damage, angiotensin-converting enzyme (ACE2) activity, and other mechanisms. In addition, they can enter the nervous system directly through the olfactory nerve, bloodstream or nerve pathways, resulting in neurological disorders. Also, coronaviruses have destructive effects on the lung tissue and cause a series of lung lesions such as hypoxia [154].

Extensive secretion of cytokines has been shown to occur prematurely in severe cases of COVID-19, and this can be a factor in the rapid progression of the disease. Multiple organ failure (Fig. 1) observed in many patients is caused by the storm of inflammatory cytokines, including interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-7, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, and gamma interferon (IFN $\gamma$ ), which is possibly associated with diffuse macrophage activity [154]. Excessive systemic inflammation or induced cytokine cascade may be associated with lymphocytopenia, and is one of the characteristics of severe inflammatory disease [90]. Systemic inflammation indicates an advanced stage of acute disease which is characterized by multiple organ failure and elevated key inflammatory markers [125]. Based on clinical data, these inflammatory

markers include IL-6, IL-2, IL-7, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IFN $\gamma$  inducible protein (IP)-10, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP) 1- $\alpha$ , granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), C-reactive protein (CRP), procalcitonin and ferritin [62, 90, 119, 125, 148]. Following a viral infection, these cytokines activate the pathways that lead to the differentiation of immune cells, the migration of leukocytes to the sites of infection, and the proliferation of hematopoietic stem cells [139].

Responses to viruses as well as compatible immune responses during viral infections differ between men and women [147]. Women have been shown to have higher inflammatory, antiviral, and humoral immune responses than men during viral infections [147], which help the better clearance of viruses, including SARS-CoV [18]. Enhanced immunity in women can lead to more immunopathology and tissue damage in the late stages of viral disease [145]. This review article intends to address the effects of COVID-19 on different systems of the body, the issue of gender differences in the outcomes of COVID-19, and separation of different body systems if we can find any research on that (Fig. 2). With this review, the research gap in this area will be identified and maybe better treatment management will be provided when the effects of gender difference are taken into consideration.

## COVID-19 and gender differences

A published study of 168 patients with severe COVID-19 in Wuhan, China, reported that men were hospitalized and died more than women, and few of them were discharged during the study period [91]. A difference between men and women at the ages of 60 and older is evident. In this study, the ratio of neutrophils to lymphocytes and serum C-reactive protein concentration were twice as high in men with COVID-19 then in women with the same disease. These data suggest that inflammatory immune responses and cell counts may be higher in men, and also can be associated with worse COVID-19 outcomes in men than in women [91].

Studies conducted on mice have shown that, the males are more susceptible to coronavirus infection than females [27, 66, 131]. Another study reported that male patients with COVID-19 were 65% more likely to die than women with the same disease. The World Health Organization states that a smaller percentage of women infected with the virus die from it in comparison with the men [85]. Another study also reported that female patients were less in need of intensive care compared to male patients [44].

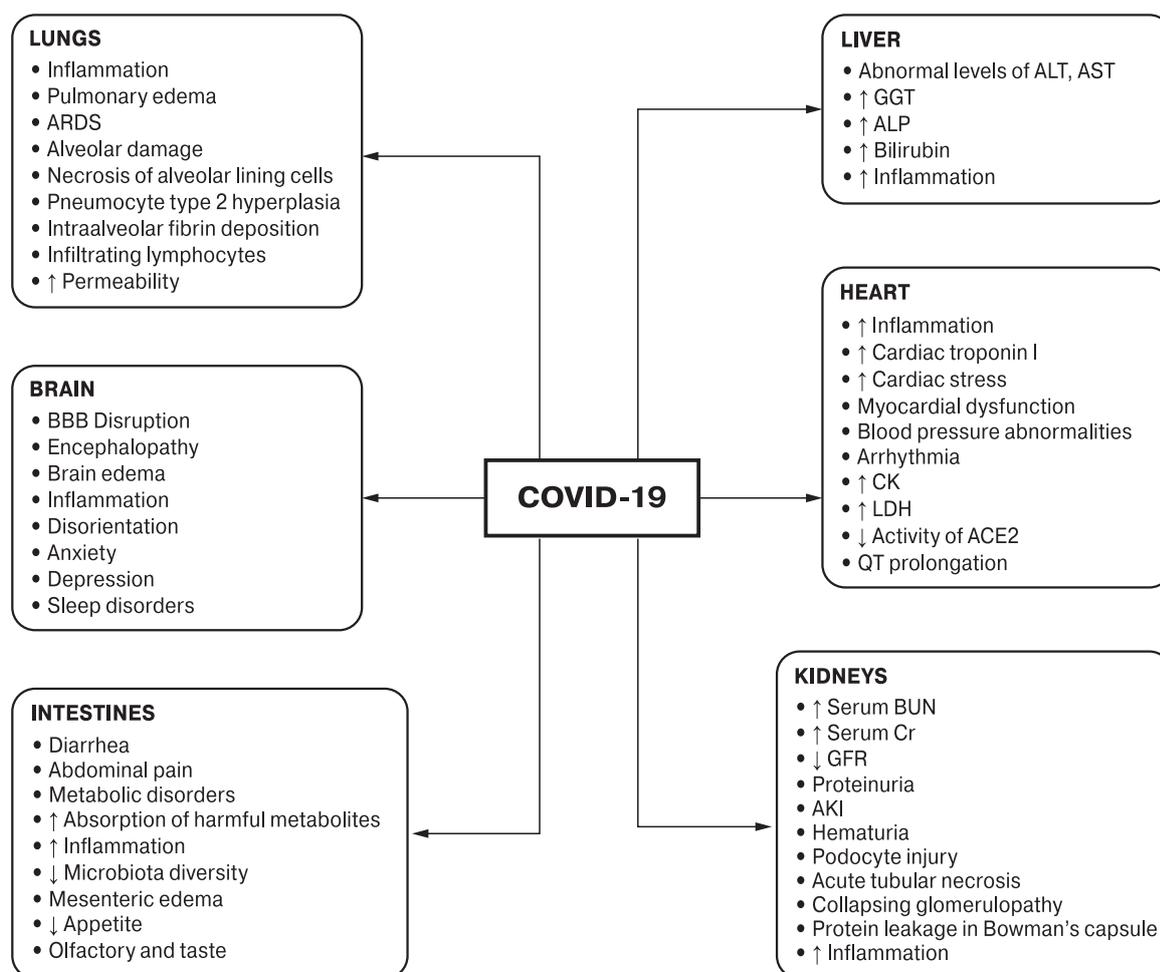
The potential factors influencing these gender differences need to be identified. Numerous factors, such as immune system, sex hormones, physiological factors, lifestyle and socio-cultural behaviors are likely to be responsible for these differences [9, 10, 14, 16, 27, 52].

Women's immune cells are more active than men, which is associated with the stimulation of Toll-like receptor 7 (TLR-7) and production of interferon [26]. In addition, after infection with viral agents, women produce lower levels of IL-6 than men, which are associated with longer life expectancy [26, 111]. In the face of viral infections, women's immune system functions differently from men's; this triggers a stronger immune response that leads to viral clearance. In general, antibody production in women is higher and lasts for longer than in men. Differences in women's immune responses may be related to sex hormones and factors related to X chromosome [59, 72]. Female sex steroids [121, 128] regulates inflammatory responses as well as immune system-regulating genes located on the X chromosome [80, 114, 132], so it can be assumed that cytokine cascades, which are associated with impaired regulation of immune system, occur less frequently in women than in men [80, 97].

Sex steroids are potential modulators of the immune system, and different concentrations of estro-

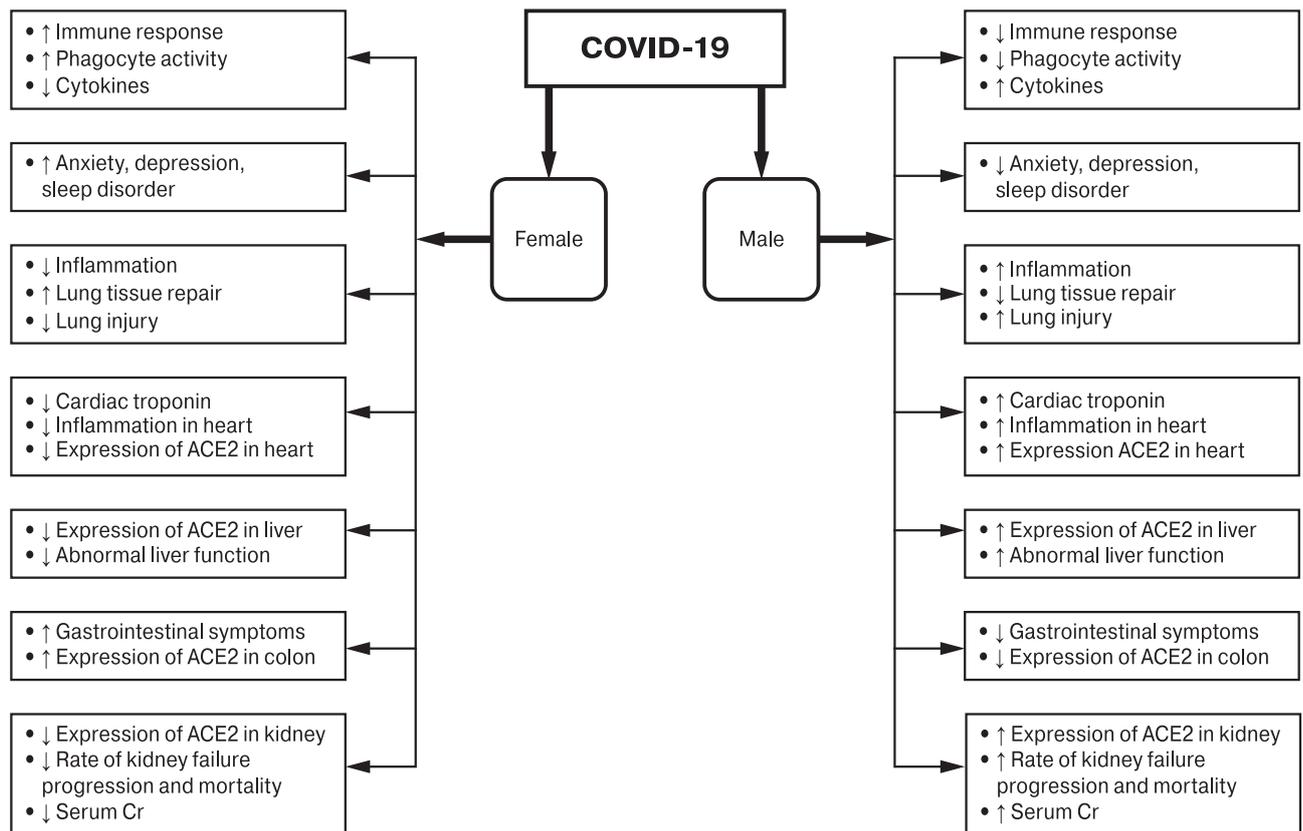
gens, progesterone, and androgens between men and women, in addition to genetics, are likely to affect immune responses to COVID-19 and inflammatory outcomes. This is especially important because acute illnesses, such as COVID-19, may alter the function of gonadal-hypothalamic-pituitary axis and reduce the endogenous production of estrogens and progesterone [88].

Among factors that cause gender differences in the outcome of COVID-19, the role of sex hormones that affect immune responses should not be ignored. Some studies suggest that estrogen therapy plays an important role in the creation of protective immune response against COVID-19 [134]. It has been reported that female sex hormones, especially estrogen, can lead to better outcomes and greater resistance to COVID-19 in women. This resistance is due to the systemic and local effect of female hormones on different cells. In particular, estrogens stimulate the immune system by modulating the function of B cells and improving the activity of T-helper 2 cells (Th2) [137]. Estrogen boosts immune respons-



**Figure 1. Systemic effects of COVID-19**

**Note.** ↑ — increase; ↓ — decrease; ACE2 — angiotensin-converting enzyme 2; AKI — acute kidney injury; ALP — alkaline phosphatase; ALT — alanine transaminase; ARDS — acute respiratory distress syndrome; AST — aspartate transaminase; BBB — blood-brain barrier; BUN — blood urea nitrogen; CK — creatine kinase; COVID-19 — coronavirus disease; Cr — creatinine; GFR — glomerular filtration rate; GGT — gamma-glutamyltransferase; LDH — lactate dehydrogenase.



**Figure 2. Gender difference in the effects of COVID-19 on body different systems**

**Note.** ↑ — increase; ↓ — decrease; ACE2 — angiotensin-converting enzyme 2; COVID-19 — coronavirus disease; Cr — creatinine.

es, causing virus clearance to occur more quickly and vaccines to be more effective [4, 66]. In most human or rodent experimental models, the anti-inflammatory effects of estradiol (E2) on innate immunity include suppression of the production of inflammatory cytokines (such as IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ ) by monocytes and macrophages (TNF $\alpha$  is a major factor in cytokine cascade of COVID-19), strong inhibition of chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), and prevention of innate immune cell migration to inflamed areas, especially neutrophils and monocytes [88]. E2 produces helper T cells (CD4<sup>+</sup>) and anti-inflammatory cytokines, such as IL-4, IL-10, and IFN $\gamma$  [2].

Estrogen receptors (ERs) are expressed in all immune cells, and act as transcriptional regulators of cellular function. In human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), CD4<sup>+</sup> T lymphocytes express higher levels of ER $\alpha$ -related mRNA than ER $\beta$ , while B cells show higher levels of ER $\beta$ -related mRNA than ER $\alpha$  [107]. Peripheral blood CD8<sup>+</sup> T cells and monocytes express low levels of both receptors [107]. In female mice with COVID-19, the highest sex-specific protection was observed during their reproductive period with strong ER signaling. Therefore, in adult women, stronger ER signaling may play an important role in health protection against COVID-19 infection compared to men [18].

Progesterone (P4) is another important hormone that modulates the immune and anti-inflammatory system, which is produced at high levels by the placenta during pregnancy. Progesterone receptors (PRs) are expressed in most immune cells, including epithelial cells, macrophages, lymphocytes, mast cells, and eosinophils [72]. P4 inhibits the production of pro-inflammatory cytokines of IL-1 $\beta$  and IL-12 by human and rodents' macrophages and dendritic cells [72, 108, 135]. Also, P4 treatment fastens recovery by increasing Transforming growth factor (TGF- $\beta$ ), IL-6, IL-22, and number of Th17 cells [54].

Plasma testosterone levels decreases with age, and studies in older men with COVID-19 [7] show that low testosterone level is associated with high inflammatory conditions [83]. In addition, testosterone therapy has been shown to reduce IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  [96]. However, unlike estrogen, testosterone has been shown to play an inhibitory role in the body's immune processes, which is a further possible explanation for men's susceptibility to infections [4]. High and low testosterone concentrations appear to increase the risk of infection and possible complications of COVID-19 [129].

Due to the age-related decrease in sex hormones in the elderly, these hormones can be suggested as a treatment option and may help reduce inflammation in elderly patients with COVID-19 [69, 105].

## COVID-19 and the nervous system

Outcomes of severe COVID-19 in patients include destruction of blood-brain barrier (BBB) and secondary intracranial infection, which may cause headache, vomiting, loss of vision, and seizures [109]. Viral encephalitis, infectious toxic encephalopathy, and acute cerebrovascular disease are some of the neurological diseases associated with COVID-19 [154].

Encephalitis is known as one of the symptoms of COVID-19. Encephalitis refers to inflammatory lesions in the brain parenchyma, including neuronal damage and nerve tissue damage caused by pathogens. This disease is characterized by an acute onset and its common symptoms include headache, fever, vomiting, seizure, and disturbances of consciousness [36]. Early detection of viral encephalitis is very important [156].

Infectious toxic encephalopathy, also known as acute toxic encephalopathy, refers to a syndrome of reversible brain dysfunction caused by factors such as systemic toxemia, metabolic disorders, and hypoxia during the acute infection process [95, 138, 161]. Major pathological changes in this disease include cerebral edema for which there is no evidence of inflammation in cerebrospinal fluid analysis. Patients with a mild course of the disease may experience headache, delirium, mental disorders, and anxiety. Patients with high severity of the disease may experience loss of consciousness, disorientation, coma, and paralysis [33, 95]. Acute viral infection is one of the major causes of this disease, which is exemplified by CoV-induced respiratory infection. Patients with COVID-19 often have severe hypoxia and viremia [50], which can lead to toxic encephalopathy. In addition, approximately 40% of patients with COVID-19 develop headache, loss of consciousness, and other symptoms of brain dysfunction [87]. One study reported that edema was diagnosed in the brain tissue of patients with COVID-19. In general, these findings provide evidence that COVID-19 can cause infectious toxic encephalopathy [159].

In the case of acute cerebrovascular disease, there is considerable evidence that respiratory-related infection is an independent risk factor for it [35, 150]. Data from laboratory models show that the influenza (flu) virus can exacerbate ischemic brain damage by stimulating a cytokine cascade, and increase the risk of cerebral hemorrhage following a treatment with tissue-type plasminogen activator [101]. The CoV infection, particularly SARS-CoV-2, has been widely reported to cause a cascade of cytokines, which may be one of the factors, by which CoV causes acute brain disease [20, 90].

In fact, although severe respiratory complication is the most common symptom in patients with COVID-19 that leads to hospitalization in intensive care units, some patients have also shown neurologi-

cal symptoms, which are classified in three categories; symptoms of CNS disease (headache, dizziness, impaired consciousness, ataxia, acute cardiovascular disease and epilepsy), symptoms of peripheral nervous system (PNS) (hypogeusia, hyposmia, neuralgia) and symptoms of musculoskeletal [78, 87].

According to reports, hACE2 (human angiotensin-converting enzyme-2 receptor), like other organs in the brain, is expressed primarily in the brainstem and in areas involved in cardiovascular function and blood pressure regulation [45, 155]. It is also considered the entry point of SARS-CoV-2 virus in human, which is why the brain is not immune to viral infection. It has been reported that ACE2 levels are different in men and women, and women have lower levels of ACE2 than men [85].

Although SARS-CoV-2 has not yet been detected in cerebrospinal fluid, SARS-CoV has been identified in cerebrospinal fluid of patients with similar structural and functional characteristics, indicating the virus's ability to cause extremely severe BBB damage [78]. If previous studies with other CoVs are considered, SARS-CoV-2, like other members of its family, first infects peripheral nerve terminals and then slowly travels to CNS through the synaptic pathway [140]. Reported involuntary respiration, hyposmia, and ageusia in patients with COVID-19 have speculated that SARS-CoV-2 not only infects the lungs but also significantly affects neurons, especially in the medulla oblongata, which regulates pulmonary and cardiac function, and any damage to it can lead to chronic respiratory distress, which has been reported in COVID-10 patients [78]. Recently, more serious complications including acute hemorrhagic necrotizing encephalopathy (ANE) have been reported in studies [112]. ANE is a rare complication of viral infections such as flu, and is associated with a significant increase in intracranial cytokines, leading to the failure of BBB [118].

One study found that more than a quarter of people with COVID-19 suffered from mental illness, anxiety and depression, and about a third had sleep disorders. In addition, the prevalence of anxiety and depression in COVID-19 pandemic was higher than the 2003 acute respiratory syndrome (SARS) epidemic. Endocrine system function often plays a role in the biological explanation of gender differences in psychological outcomes, so that the prevalence of anxiety, depression and sleep disorders in women with COVID-19 is much higher than men. Decreased estrogen may increase the risk of anxiety in women [92]. Effective treatment for anxiety in women should eliminate mental illness and also should include comprehensive interventions such as hormone regulation. Approximately 30.6% of patients showed sleep problems [42]. Regarding the effect of COVID-19 on the nervous system, not much study was found to examine the effect of sex differences in this regard.

## COVID-19 and the respiratory system

There is a crosstalk between the brain and lungs during COVID-19 infection. SARS-CoV-2 uses ACE2 as a receptor for viral cell entry, and induces lung damage by increasing cytokines in the immune system, which can reduce the expression of central ACE2 protein. Inhibition of ACE2 activity reduces the sensitivity of baroreceptor reflex that controls heart rate and also increases sympathetic tone, which ultimately leads to increased blood pressure and impaired heart function. In addition, in the case of neuroprotective property of ACE2, its inhibition may upset the neurotoxicity/neuroprotection balance within the brain. Elevated inflammatory cytokines during lung injury, hypoxemia, and increased sympathetic tone through inhibition of central ACE2 lead to overactive CNS, which may play a critical role in the etiopathogenesis of neurogenic pulmonary edema and possibly COVID-19 pulmonary complications in patients [57]. It has been reported that 3% to 20% of patients with COVID-19 are associated with acute respiratory distress syndrome (ARDS) [21, 48, 148]. Recent studies have shown that renin angiotensin system (RAS) activation plays an important role in acute lung injury [164]. Animals with ARDS have reduced ACE2 activity, and a lack of ACE2 can lead to excessive neutrophil accumulation, increased vascular permeability, exacerbated pulmonary edema and eventually ARDS. Exogenous ACE2 exogenous supplement can reduce the inflammatory response and increase oxygen delivery in various ARDS animal models [164].

Progressive respiratory failure is the leading cause of death in COVID-19 disease. One study showed that all lung samples from the COVID-19 group had diffuse alveolar damage with alveolar epithelial cell necrosis, pneumocyte type-2 hyperplasia, intra-alveolar fibrin deposition, and infiltration of perivascular lymphocytes. But in some people, the changes were local and they only had mild interstitial edema [86].

The lungs of patients with COVID-19 have three characteristics. First, severe endothelial damage associated with the intracellular SARS-CoV-2 virus, and destruction of endothelial cell membranes. Second, the lungs of patients with COVID-19 have extensive vascular thrombosis with microangiopathy and alveolar capillary occlusion [84, 89]. Third, the lungs of patients with COVID-19 show significant vascular growth through the intussusceptive mechanism of angiogenesis [86]. Tissue hypoxia is also observed in these patients and a large number of ACE2 positive cells are observed in the lungs of these patients [144].

Impaired intercellular connections, cell swelling, and loss of contact with the basal pulmonary membrane are shown in COVID-19 patients [144]. Another study showed that in the lungs of patients with COVID-19, there was obvious destruction of pulmonary parenchyma, including interstitial inflammation and extensive consolidation [38]. In a study

of several different patients with COVID-19, a significant increase was found in pulmonary edema in the lungs with a slight increase in consistency of the lower lobe of the lung. No local changes were observed on the incised surfaces of the lung. Histologically, in addition to detected pulmonary edema, capillary florid endotheliitis was shown in lower lobes with increased neutrophils and formation of microthrombus in alveolar capillaries and small pulmonary vessels including septal veins, and also cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-6 were increased in the lung tissue [13].

The cytokine cascade is the cause of lung tissue damage and the immunopathogenesis of COVID-19 infection. It has been shown that, the level of IL-6 (one of the important components of cytokine cascade and the driving force behind cytokine cascade) is higher in men than women [151]. High levels of IL-6 in men may be associated with worse outcomes than in women, which may indicate a higher risk of cytokine cascade in male patients. It has also been shown that antibody levels are higher in women with COVID-19 than in men [132].

COVID-19 has been shown to be transmitted through the upper respiratory tract, mucosal contact and eye conjunctiva, and droplets in the air or on surfaces contaminated by coughing or sneezing [137]. Estrogen has a beneficial effect on the upper and lower airways [137]. First, women's noses respond to changes in estrogen levels by improving the local immune response. This hormone stimulates the nasal mucosa and hypertrophy of the nasal turbinates, and increases the production of nasal mucosa, which contains mucin, electrolytes, immunoglobulin A (IgA), IgG, lysozyme, lactoferrin and oligosaccharides. These substances have antiviral and antibacterial properties that are essential against upper respiratory tract infections [51, 141]. In addition, estrogen stimulates the production of hyaluronic acid, which maintains a warm and moist environment in the nasal mucosa and cilia [51, 141]. Finally, estrogen acts directly on the nasal immune system by increasing the activity of phagocytes, dendritic cells, and natural killers [51]. Estrogen is also involved in the oral mucosa making it well hydrated by stimulating the production of hyaluronic acid, and also improves the function of lower respiratory tract by acting directly on bronchial epithelial cells, which increase the production of mucus rich in antiviral substances [136]. Estrogens, especially E2, can protect premenopausal women from the most serious side effects of COVID-19, given the higher levels of serum estrogen [46].

The positive effect of estrogen is supported by the action of progesterone, which regulates epidermal growth factor of amphiregulin by inducing lung structure repair in the event of a viral infection. Progesterone administration during menopause in women improves the outcome of lung disease [54, 136]. In a study in mice, progesterone treatment reduced the inflammatory environment of the lungs,

improved pulmonary function, and promoted cell proliferation and pulmonary repair, resulting in earlier recovery without affecting viral load [54].

## COVID-19 and the cardiovascular system

Heart damage seems to be one of the prominent features of COVID-19 disease, which occurs in 20 to 30% of hospitalized patients and contributes to 40% of deaths [62, 119, 124]. Although the clinical manifestations of COVID-19 are related to the respiratory system, some patients have severe cardiovascular damage. In addition, some patients with cardiovascular disease (CVDs) may have an increased risk of death [62]. Patients with COVID-19 who do not have cardiovascular disease have better outcomes than patients with cardiovascular disease and hypertension [168].

In patients with COVID-19, studies have shown that 51% of patients with heart disease died, while only 4.5% of patients without heart disease died from COVID-19 [62]. The mortality rate in COVID-19 patients without Cardiovascular disease (CVD) with a normal cardiac troponin (cTn) level was 7.6%. In patients with CVD and a normal cTn level, it was 13.3%. In patients without CVD and a high cTn level, it was 37.5%. In patients with CVD and a high cTn level, it was 69.4% [62]. Huang et al., reported that 12% of patients with COVID-19 were diagnosed with acute myocardial injury, which was mainly manifested by an increase in troponin I [5], and had blood pressure disorders [62, 119]. In another study, it was shown that among 138 patients with COVID-19, 17.6% had arrhythmia and 7.2% had acute heart damage [148]. There is a significant relationship between plasma troponin T levels of patients with COVID-19 and their plasma C-reactive protein and N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) levels [62]. Like SARS, patients with COVID-19 also showed potential heart damage. Chen et al. reported that out of 99 confirmed COVID-19 patients admitted to Wuhan Jinyintan Hospital, 13 (13%) showed elevated creatine kinase and 75 (76%) showed elevated lactate dehydrogenase [21].

As seen in the reports, abnormal electrocardiogram (ECG) changes have also been recorded in critical situations [58]. One study found that a high percentage of patients had prolonged QT and rare arrhythmias [63]. There are several possible mechanisms for that. First, ACE2 was first identified as a functional receptor for coronavirus that is highly expressed in the heart and lungs [143]. Therefore, ACE2-related signaling pathways may play a role in heart damage. Second, COVID-19-induced hypoxemia may damage myocardial cells. Third, systemic inflammatory responses and immune system disorders may be important factors in that [99]. However, it is also possible that the disorder may be due to decreased ACE2 activity in the heart,

just like SARS [49]. Oudit et al. observed the presence of SARS-CoV and reduced expression of ACE2 in the hearts of SARS-CoV-infected mice. They also reported that SARS-CoV was isolated from 7 autopsied human hearts among 20 patients, and the myocardial damage was associated with decreased expression of myocardial ACE2 protein [104].

In general, ACE1 converts angiotensin 1 to 2, and angiotensin 2 induces vasoconstriction, inflammation, fibrosis, and proliferation through its receptor, which ultimately increases blood pressure, cardiac fibrosis, thrombosis, and ARDS [49, 120]. On the other hand, angiotensin 2 is converted to angiotensin 1–7 by ACE2, which is a peptide without biological functions and has vasodilatory, anti-fibrotic, anti-apoptotic and anti-proliferative effects, and finally reduces blood pressure, heart fibrosis, thrombosis and ARDS [73]. COVID-19 inhibits this conversion and these effects in the heart [49].

A higher percentage of men (65.4%) had higher cardiac troponin (cTn) than women (42.2%) with COVID-19 [62]. Estrogen levels are inversely related to the expression of cTn, which is released from cardiomyocytes exposed to ischemia or hypoxia [94]. The action of estrogen may explain these findings, as estrogen has been shown to decrease the concentration of low-density lipoprotein (LDL) and increase the concentration of high-density lipoprotein (HDL) [93]. The 17 $\beta$ -Estradiol specifically mediates the activity of nitric oxide synthase (NOS) through interaction with estrogen receptors. Functional estrogen receptors are also present in cardiomyocytes, which regulate NOS expression to protect against cardiovascular damage by inhibiting platelet activity, thrombus formation, and leukocyte-endothelial cell adhesion [74].

There is growing evidence that sex and sex hormones affect many circulatory and tissue-based components of RAS such as ACE2 [41, 81]. The 17 $\beta$ -Estradiol regulates the expression of ACE2 in the heart, kidneys and uterus [65, 68]. For example, 17 $\beta$ -estradiol increases local ACE2 activity in the heart and weakens the RAS system by isolating a residue angiotensin II to enhance angiotensin 1–7 production, which protects the heart, and has anti-inflammatory and anti-oxidative effects [15, 40, 123]. Reducing the regulation of angiotensin II receptor type 1 (AT1R) by estrogens and regulating renin activity by estrogens have been shown [113, 122]. Recently, estrogen has been shown to modulate localized RAS in the atrial myocardium by down-regulating ACE1 and simultaneously regulating ACE2, AT2R, and MAS expression levels [15]. The ACE2/Ang1-7/Mas receptor axis appears to be more closely related to each other in women than in men [19].

COVID-19 infection causes harmful hypercoagulability by exacerbating patients' endothelial dysfunction [6]. Activation of endothelial estrogen receptors has been shown to increase nitric oxide

(NO) and decrease Reactive oxygen species (ROS), and also protects the vascular system against angiotensin 2-mediated vasoconstriction, inflammation, and ROS production [77, 98, 130]. Higher mortality in men seems to be partly related to the prevalence of underlying diseases. One of the most common complications of high-intensity COVID-19 is cardiovascular disease, and testosterone activates the main pathway of myocardial inflammation, while estrogen has a protective effect against cardiovascular disease [70, 74, 102]. It has been reported that, in clinical trials in which testosterone level was high, there was an increased susceptibility to cardiovascular inflammation, and these men were more vulnerable to COVID-19 [26].

## COVID-19 and liver

More than one-third of patients hospitalized with SARS-CoV-2 infection have abnormal liver function, which is associated with longer hospital stays [37]. Liver failure in 60% of patients with SARS3 and in patients infected with MERS-CoV, have been reported. Patients with severe COVID-19 appear to have higher liver dysfunction. Liver damage in severe cases of COVID-19 is more common than in mild cases [153]. One study found that 2–11% of patients with COVID-19 had liver obstruction and 14.8–53.1% had abnormal levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) during disease progression [153]. The prevalence of chronic liver disease has been shown to be relatively low in patients with COVID-19. However, individuals with severe forms of COVID-19 show significant changes in liver enzymes as well as coagulation and fibrinolytic pathways due to the innate immune response to the virus [86].

An increase in the prevalence of liver injury in patients with COVID-19 was reported from 39.6% to 43.4%, which was mainly associated with increased ALT and AST as well as hypoalbuminemia [21, 149]. In one study, 132 patients with liver damage were found to have slight increase in total bilirubin (TBIL), of whom 72 were male (54.5%) and 60 were female (45.5%), [149]. Another study found that among COVID-19 patients admitted to an American academic medical center, 69% had abnormal liver biochemical factors at the time of admission and 93% had higher-than-normal hepatic biochemical factors during hospitalization. Approximately one in five hospitalized patients was at risk for grade 3 or 4 liver injury [11].

It has also been shown that the level of gamma glutamyl transferase (GGT), a biological diagnostic marker for cholangiocyte damage, increases in COVID-19 patients. Increased alkaline phosphatase (ALP) levels have also been observed in several COVID-19 patients during hospitalization [162]. Another study showed that ACE2 receptor expression

in infinite cholangiocytes increases and this suggests that SARS-CoV-2 may bind directly to ACE2-positive cholangiocytes to impair liver function [17].

Liver damage in patients with COVID-19 infection may be directly due to viral infection of the liver cells. Approximately 2–10% of patients with COVID-19 have diarrhea, and SARS-CoV-2 RNA has been detected in fecal and blood samples [160]. This evidence suggests that, the virus may be present in the liver. Both SARS-CoV-2 and SARS-CoV bind to ACE2 receptor in order to enter the target cell (148), where the virus multiplies and subsequently infects other cells in the upper respiratory tract and lung tissue. Patients then begin to show clinical signs and symptoms [162].

Immune-mediated inflammation, such as cytokine influx and pneumonia-induced hypoxia, may also contribute to liver damage or even liver failure in patients with COVID-19, who are in critical stages of the disease [162]. In these patients, the mild acute hepatic congestion and activation of non-inflamed Kupffer cells have been shown [13]. A recent study reported that moderate microvascular steatosis and mild lobular and portal activity occur in liver biopsy specimens, indicating that liver damage can be caused by SARS-CoV-2 infection [159].

After SARS-CoV-2 infection, pathogenic T cells are rapidly activated, producing granulocyte-macrophage (GM-CSF), IL-6, and other inflammatory factors, and also activate inflammatory monocytes CD14<sup>+</sup> and CD16<sup>+</sup>, resulting in higher levels of IL-6 and other inflammatory factors, which lead to an inflammatory storm and immune damage to the liver. IL-6 and GM-CSF are two important inflammatory factors that cause inflammatory storm in patients with COVID-19 [39]. One study found that, the prevalence of liver damage in male patients was higher than female ones [47]. Abnormal liver function has been shown to be more common in men with COVID-19 than in women, who have higher inflammatory markers such as C-reactive protein and procalcitonin [37]. ACE2 expression in the liver of women is very low compared to men [110].

## COVID-19 and gastrointestinal tract

COVID-19 infection may be present in the intestine, leading to gastrointestinal symptoms such as diarrhea and abdominal pain. Intestinal metabolic disorders caused by this disease increase the absorption of harmful metabolites, which affects the function of central nervous system through the intestinal axis and brain, and then leads to dizziness and fatigue. These metabolites are also harmful to liver tissue [170]. Although patients usually have fever and respiratory symptoms, some have gastrointestinal symptoms such as diarrhea, vomiting, and abdominal pain [47]. In the small intestine, mesenteric edema and peritoneal fluid have also been observed [8].

Studies have shown that RNA of SARS-CoV-2 is present in anal/rectal swabs and fecal samples of COVID-19 patients, even after virus clearance from the upper respiratory tract [158, 166]. In addition, ACE2 expression has been observed in gastrointestinal epithelial cells [55, 157]. Zhang et al., reported that ACE2 is expressed in esophageal epithelial cells and enterocytes in ileum and colon [163]. Intestinal epithelial cells, especially small intestinal enterocytes, also express ACE2 receptors. In the intestine, ACE2 regulates the absorption of amino acids and the balance of intestinal bacteria to reduce intestinal inflammation [56], and because ACE2 is the entry point of virus, the presence of ACE2 predisposes the intestine to viral infection [76].

The role of intestinal microbiota in lung diseases is well confirmed. Respiratory viral infections have also been shown to disrupt the intestinal microbiota. Diet, environmental factors and genetics play an important role in the formation of intestinal microbiota that can affect immunity [29, 34, 53, 146]. The diversity of intestinal microbiota is decreased in old age and COVID-19 has been mainly fatal for elderly patients, pointing again to the role that intestinal microbiota play in this disease [32, 82, 100].

Odor and taste disorders are common in patients with mild to moderate COVID-19. One study reported that in women infected with COVID-19, the rate of gastrointestinal symptoms, including diarrhea, loss of appetite, and olfactory and taste disturbances, was almost twice as high as in infected men [126], which were accompanied by higher levels of inflammation and poorer liver function [170].

Levels of ACE2 expression in adipose and subcutaneous tissue of the large intestine are significantly higher in women than in men [142]. Another study found that, the proportion of gastrointestinal symptoms in female patients was significantly higher than in male patients. Clinical manifestations such as sore throat, dizziness, and fatigue were also more common in patients with gastrointestinal symptoms [170].

## COVID-19 and kidney

Although COVID-19 infection is primarily a respiratory disease, other organs, including the kidneys, are often affected by it [60]. Acute kidney injury (AKI) is one of the major complications of COVID-19, which occurs in 0.5–7% of cases and in 2.9–23% of ICU patients [48, 62]. In a cohort study, 43.9% of hospitalized patients had proteinuria and 26.7% had hematuria. The prevalence of high serum creatinine, hyperuricemia and estimated glomerular filtration rate below 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> were 14.4, 13.1 and 1.13%, respectively. During the study period, AKI occurred in 5.1 patients [23].

Podocytes and proximal direct tubule cells, as kidney cells, host the virus. According to the findings, the effects of SARS-CoV-2 cytopathy on po-

docytes and proximal direct tubule may cause AKI in patients with COVID-19. Podocytes and proximal direct tubule cells play an important role in urine purification, reabsorption and excretion. It should be noted that podocytes are particularly vulnerable to viral and bacterial attacks, and podocyte damage easily induces heavy proteinuria [64]. As the data from one study showed, 43.9% of patients infected with SARS-CoV-2, especially patients with AKI, had proteinuria [24].

In the case of renal histopathology in COVID-19 patients, in one study, significant ATI and occlusion of microvascular lumens were observed mainly by red blood cells with endothelial damage as well as glomerular and vascular changes [132]. These findings suggest that, the COVID-19 infection causes direct infection of renal parenchyma and possibly secondary endothelial damage. Acute tubular injury is associated with loss of edging brushes and non-isometric vacuolation, which may in part be due to the direct effect of SARS-CoV-2, as demonstrated by ultrastructural evaluation [133]. A study showed an important relationship between AKI and respiratory failure for the following reasons [60]:

First, severe AKI usually occurs during intubation and mechanical ventilation. Second, the AKI rate in patients under mechanical ventilation was 89.7%, while in other patients it was 21.7%. Third, severe AKI (stages 2 and 3) occurred in 65.5% of patients using mechanical ventilation compared with 6.7% of patients who were not using mechanical ventilation [60].

The most obvious risk factors for the development of AKI in COVID-19 patients have been the need for ventilator support or treatment with vasopressor. Reported risk factors for poor COVID-19 outcomes, include aging, male gender, and high Body mass index (BMI) [22, 67, 127, 165, 169].

This virus has also been shown to cause interstitial inflammation, acute tubular necrosis, podocytopathy, microangiopathy, and collapsing glomerulopathy [71, 75, 103, 106]. Another study found that in patients with COVID-19, endothelium in the kidney, which is responsible for proteinuria, is affected by the disease [117]. In addition, virus particles are present in renal endothelial cells. The viraemia is considered as a possible cause of endothelial damage in the kidney and a possible cause of AKI. Also, SARS-CoV-2 can directly infect renal tubular epithelium and podocytes via ACE2-dependent pathway, causing mitochondrial dysfunction, acute tubular necrosis, formation of protein reabsorption vacuoles, collapsing glomerulopathy, and protein leaks into Bowman capsules [75, 133].

Another potential mechanism for the development of AKI is impaired regulation of immune response to COVID-19 virus [116, 169]. Other factors that may contribute to AKI include rhabdomyolysis, macrophage activation syndrome, and the development

of micro-embolism and micro-thrombosis in the context of hypercoagulability and endotheliitis [144, 167].

Although the incidence of chronic kidney disease is more common in women, the progression of kidney failure and mortality is higher in men [25]. There is a significant interaction between sex hormones and ACE2 expression. Removal of ovaries increased ACE2 expression in the kidney and adipose tissue of women, and estradiol replacement decreased ACE2 expression [41]. Also, testosterone appears to increase ACE2 levels in the kidneys, while estrogen decreases ACE2 expression in the kidneys [41, 43]. Compared to men, women showed lower levels of serum monocytes and creatinine [61].

## Conclusion

Sex differences have been reported in the effects of COVID-19 on the respiratory system, cardiovas-

cular system, liver and kidneys. This sex difference appears to be attributable to levels of ACE2, a high expression of which has been reported in males. Estrogen, and perhaps progesterone, may regulate localized ACE2 levels, thereby reducing inflammation and oxidative stress, leading to protection against the virus. Further studies are needed to investigate the impact of sex differences on the nervous and gastrointestinal systems to better manage COVID-19 treatment.

## Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Funding

Not applicable.

## References

- Ackermann M., Verleden S.E., Kuehnel M., Haverich A., Welte T., Laenger F., Vanstapel A., Werlein C., Stark H., Tzankov A., Li W.W., Li V.W., Mentzer S.J., Jonigk D. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in COVID-19. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 383, no. 1, pp. 20–128. doi: 10.1056/NEJMoa2015432
- Amadori A., Zamarchi R., De Silvestro G., Forza G., Cavatton G., Danieli G.A., Clementi M., Chieco-Bianchi L. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat. Med.*, 1995, vol. 11, no. 2, pp. 1279–1283. doi: 10.1038/nm1295-1279
- Baig A.M., Khaleeq A., Ali U., Syeda H. Evidence of the COVID-19 virus targeting the CNS: tissue distribution, host–virus interaction, and proposed neurotropic mechanisms. *ACS Chem. Neurosci.*, 2020, vol. 11, no. 7, pp. 995–998. doi: 10.1021/acscemneuro.0c00122
- Bartz D., Chitnis T., Kaiser U.B., Rich-Edwards J.W., Rexrode K.M., Pennell P.B., Goldstein J.M., O’Neal M.A., LeBoff M., Behn M., Seely E.W., Joffe H., Manson J.E. Clinical advances in sex-and gender-informed medicine to improve the health of all: a review. *JAMA Intern. Med.*, 2020, vol. 1804, no. 5, pp. 74–83. doi: 10.1001/jamainternmed.2019.7194
- Bernheim A., Mei X., Huang M., Yang Y., Fayad Z.A., Zhang N., Diao K., Lin B., Zhu X., Li K., Li S., Shan H., Jacobi A., Chung M. Chest CT findings in coronavirus disease-19 (COVID-19): relationship to duration of infection. *Radiology*, 2020: 200463. doi: 10.1148/radiol.2020200463
- Berthelot J.-M., Drouet L., Lioté F. Kawasaki-like diseases and thrombotic coagulopathy in COVID-19: delayed over-activation of the STING pathway? *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, vol. 9, no. 1, pp. 1514–1522. doi: 10.1080/22221751.2020.1785336
- Bhasin S., Brito J.P., Cunningham G.R., Hayes F.J., Hodis H.N., Matsumoto A.M., Snyder P.J., Swerdloff R.S., Wu F.C., Yialamas M.A. Testosterone therapy in men with hypogonadism: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrin. Metabol.*, 2018, vol. 103, no. 5, pp. 1715–1744. doi: 10.1210/jc.2018-00229
- Bianco F., Ranieri A., Paterniti G., Pata F., Gallo G. Acute intestinal ischemia in a patient with COVID-19. *Tech. Coloproctology*, 2020, vol. 24: 1217–1218. doi: 10.1007/s10151-020-02255-0
- Binder E., Künzel H., Nickel T., Kern N., Pfennig A., Majer M., Uhr M., Ising M., Holsboer F. HPA-axis regulation at in-patient admission is associated with antidepressant therapy outcome in male but not in female depressed patients. *Psychoneuroendocrinology*, 2009, vol. 34, no. 1, pp. 99–109. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.08.018
- Blau F.D., Kahn L.M. Gender differences in pay. *J. Econ. Perspect.*, 2000, vol. 14, no. 4, pp. 75–99. doi: 10.1257/jep.14.4.75
- Bloom P.P., Meyerowitz E.A., Reinus Z., Daidone M., Gustafson J., Kim A.Y., Schaefer E., Chung R.T. Liver biochemistries in hospitalized patients with COVID-19. *Hepatology*, 2021, vol. 73, no. 3, pp. 890–900. doi: 10.1002/hep.31326
- Bohmwald K., Galvez N., Ríos M., Kalergis A.M. Neurologic alterations due to respiratory virus infections. *Front. Cell Neurosci.*, 2018, vol. 12: 386. doi: 10.3389/fncel.2018.00386
- Bösmüller H., Traxler S., Bitzer M., Häberle H., Raiser W., Nann D., Frauenfeld L., Vogelsberg A., Klingel K., Fend F. The evolution of pulmonary pathology in fatal COVID-19 disease: an autopsy study with clinical correlation. *Virchows Archiv.*, 2020, vol. 477, no. 3, pp. 349–357. doi: 10.1007/s00428-020-02881-x
- Brown R.P., Josephs R.A. A burden of proof: Stereotype relevance and gender differences in math performance. *J. Pers. Soc. Psychol.*, 1999, vol. 76, no. 2: 46. doi: 10.1037/0022-3514.76.2.46
- Bukowska A., Spiller L., Wolke C., Lendeckel U., Weinert S., Hoffmann J., Bornfleth P., Kutschka I., Gardemann A., Isermann B., Goette A. Protective regulation of the ACE2/ACE gene expression by estrogen in human atrial tissue from elderly men. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2017, vol. 2421, no. 4, pp. 1412–1423. doi: 10.1177/1535370217718808
- Byrnes J.P., Miller D.C., Schafer W.D. Gender differences in risk taking: a meta-analysis. *Psychol. Bull.*, 1999, vol. 125, no. 3, pp. 367–383.
- Chai X., Hu L., Zhang Y., Han W., Lu Z., Ke A., Zhou J., Shi G., Fang N., Fan J., Cai J., Fan J., Lan F. Specific ACE2 expression in cholangiocytes may cause liver damage after 2019-nCoV infection. *Biorxiv*, 2020. doi: 10.1101/2020.02.03.931766

18. Channappanavar R., Fett C., Mack M., Ten Eyck P.P., Meyerholz D.K., Perlman S. Sex-based differences in susceptibility to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Immunol.*, 2017, vol. 198, no. 10, pp. 4046–4053. doi: 10.4049/jimmunol.1601896
19. Chappell M.C., Marshall A.C., Alzayadneh E.M., Shaltout H.A., Diz D.I. Update on the angiotensin converting enzyme 2-angiotensin (1–7)-Mas receptor axis: fetal programming, sex differences, and intracellular pathways. *Front. Endocrinol.*, 2014, vol. 4: 201. doi: 10.3389/fendo.2013.00201
20. Chen C., Zhang X., Ju Z., He W. Advances in the research of cytokine storm mechanism induced by Corona Virus Disease 2019 and the corresponding immunotherapies. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 2020, vol. 36, no. 6, pp. 471–475. doi: 10.3760/cma.j.cn501120-20200224-00088
21. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., Qiu Y., Wang J., Liu Y., Wei Y., Xia J., Yu T., Zhang X., Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 2020, vol. 39510223, no. 5, pp. 507–513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7
22. Chen R., Liang W., Jiang M., Guan W., Zhan C., Wang T., Tang C., Sang L., Liu J., Ni Z., Hu Y., Liu L., Shan H., Lei C., Peng Y., Wei L., Liu Y., Hu Y., Peng P., Wang J., Liu J., Chen Z., Li G., Zheng Z., Qiu S., Luo J., Ye C., Zhu S., Liu X., Cheng L., Ye F., Zheng J., Zhang N., Li Y., He J., Li S., Zhong N; Medical Treatment Expert Group for COVID-19. Risk factors of fatal outcome in hospitalized subjects with coronavirus disease 2019 from a nationwide analysis in China. *Chest*. 2020, vol. 158, no. 1, pp. 97–105. doi: 10.1016/j.chest.2020.04.010
23. Cheng Y., Luo R., Wang K., Zhang M., Wang Z., Dong L., Li J., Yao Y., Ge S., Xu G. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int.*, 2020, vol. 975, no. 8, pp. 829–838. doi: 10.1016/j.kint.2020.03.005
24. Cheng Y., Luo R., Wang K., Zhang M., Wang Z., Dong L., Li J., Yao Y., Ge S., Xu G. Kidney impairment is associated with in-hospital death of COVID-19 patients. *MedRxiv*, 2020. doi: 10.1101/2020.02.18.20023242.
25. Cobo G., Hecking M., Port F.K., Exner I., Lindholm B., Stenvinkel P., Carrero J.J. Sex and gender differences in chronic kidney disease: progression to end-stage renal disease and haemodialysis. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2016, vol. 13014, no. 1, pp. 1147–1463. doi: 10.1042/CS20160047
26. Conti P., Younes A. Coronavirus COV-19/SARS-CoV-2 affects women less than men: clinical response to viral infection. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 2020, vol. 342, no. 3, pp. 339–343. doi: 10.23812/Editorial-Conti-3
27. Darnall B.D., Suarez E.C. Sex and gender in psychoneuroimmunology research: past, present and future. *Brain Behav. Immun.*, 2009, vol. 235, no. 5, pp. 595–604. doi: 10.1016/j.bbi.2009.02.019
28. Das G., Mukherjee N., Ghosh S. Neurological insights of COVID-19 pandemic. *ACS Chem. Neurosci.*, 2020, vol. 119, no. 1, pp. 1206–1209. doi: 10.1021/acchemneuro.0c00201
29. De Filippis F., Pellegrini N., Vannini L., Jeffery I.B., La Storia A., Laghi L., Serrazanetti D.I., Di Cagno R., Ferrocino I., Lazzi C., Turroni S., Coccolini L., Brigidi P., Neviani E., Gobbetti M., O’Toole P.W., Ercolini D. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*. 2016, vol. 651, no. 11, pp. 1812–1821. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309957
30. Desforges M., Le Coupanec A., Dubeau P., Bourgooin A., Lajoie L., Dubé M., Talbot P.J. Human coronaviruses and other respiratory viruses: underestimated opportunistic pathogens of the central nervous system? *Viruses*. 2020, vol. 12, no. 1: 14. doi: 10.3390/v12010014
31. Desforges M., Le Coupanec A., Stodola J.K., Meessen-Pinard M., Talbot P.J. Human coronaviruses: viral and cellular factors involved in neuroinvasiveness and neuropathogenesis. *Virus Res.*, 2014, vol. 194, pp. 145–158. doi: 10.1016/j.virusres.2014.09.011
32. Dhar D., Mohanty A. Gut microbiota and COVID-19-possible link and implications. *Virus Res.*, 2020, vol. 285: 198018. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198018
33. Dobbs M.R. Toxic encephalopathy. *Semin. Neurol.*, 2011, vol. 31, no. 2, pp. 184–193. doi: 10.1055/s-0031-1277989
34. Earley Z.M., Akhtar S., Green S.J., Naqib A., Khan O., Cannon A.R., Hammer A.M., Morris N.L., Li X., Eberhardt J.M., Gamelli R.L., Kennedy R.H., Choudhry M.A. Burn injury alters the intestinal microbiome and increases gut permeability and bacterial translocation. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 7: e0129996. doi: 10.1371/journal.pone.0129996
35. Elkind M.S. Why now? Moving from stroke risk factors to stroke triggers. *Curr. Opin. Neurol.*, 2007, vol. 20, no. 1, pp. 51–57. doi: 10.1097/WCO.0b013e328012da75
36. Ellul M., Solomon T. Acute encephalitis — diagnosis and management. *Clin. Med. (Lond.)*, 2018, vol. 18, no. 2, pp. 155–159. doi: 10.7861/clinmedicine.18-2-155
37. Fan Z., Chen L., Li J., Cheng X., Yang J., Tian C., Zhang Y., Huang S., Liu Z., Cheng J. Clinical features of COVID-19-related liver damage. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2020, vol. 18, no. 7, pp. 1561–1566. doi: 10.1016/j.cgh.2020.04.002
38. 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
39. Feng G., Zheng K.I., Yan Q.Q., Rios R.S., Targher G., Byrne C.D., Poucke S.V., Liu W.Y., Zheng M.H. COVID-19 and liver dysfunction: current insights and emergent therapeutic strategies. *J. Clin. Transl. Hepatol.*, 2020, vol. 8, no. 1, pp. 18–24. doi: 10.14218/JCTH.2020.00018
40. Ferreira A.J., Murça T.M., Fraga-Silva R.A., Castro C.H., Raizada M.K., Santos R.A. New cardiovascular and pulmonary therapeutic strategies based on the Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1–7)/mas receptor axis. *Int. J. Hypertens.*, 2012: 147825. doi: 10.1155/2012/147825
41. Fischer M., Baessler A., Schunkert H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.*, 2002, vol. 53, no. 3, pp. 672–677. doi: 10.1155/2012/147825
42. Fu W., Wang C., Zou L., Guo Y., Lu Z., Yan S., Mao J. Psychological health, sleep quality, and coping styles to stress facing the COVID-19 in Wuhan, China. *Transl. Psychiatry*, 2020, vol. 10: 225. doi: 10.1038/s41398-020-00913-3
43. Gebhard C., Regitz-Zagrosek V., Neuhauser H.K., Morgan R., Klein S.L. Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. *Biol. Sex Differ.*, 2020, vol. 11: 29. doi: 10.1186/s13293-020-00304-9

44. Gemmati D., Bramanti B., Serino M.L., Secchiero P., Zauli G., Tisato V. COVID-19 and individual genetic susceptibility/receptivity: role of ACE1/ACE2 genes, immunity, inflammation and coagulation. Might the double X-chromosome in females be protective against SARS-CoV-2 compared to the single X-chromosome in males? *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 10: 3474. doi: 10.3390/ijms21103474
45. Gowrisankar Y.V., Clark M.A. Angiotensin II regulation of angiotensin-converting enzymes in spontaneously hypertensive rat primary astrocyte cultures. *J. Neurochem.*, 2016, vol. 138, no. 1, pp. 74–85. doi: 10.1111/jnc.13641
46. Grandi G., Facchinetti F., Bitzer J. The gendered impact of coronavirus disease (COVID-19): do estrogens play a role? *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care*, 2020, vol. 25, no. 3, pp. 233–234. doi: 10.1080/13625187.2020.1766017
47. Gu J., Han B., Wang J. COVID-19: gastrointestinal manifestations and potential fecal–oral transmission. *Gastroenterology*, 2020, vol. 158, no. 6, pp. 1518–1519. doi: 10.1053/j.gastro.2020.02.054
48. 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 NS; China Medical Treatment Expert Group for COVID-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 382, pp. 1708–1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032
49. Guo J., Huang Z., Lin L., Lv J. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) and cardiovascular disease: a viewpoint on the potential influence of angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin receptor blockers on onset and severity of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *J. Am. Heart Assoc.*, 2020, vol. 9, no. 7: e016219. doi: 10.1161/JAHA.120.016219
50. Guo Y.R., Cao Q.D., Hong Z.S., Tan Y.Y., Chen S.D., Jin H.J., Tan K.S., Wang D.Y., Yan Y. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status. *Mil. Med. Res.*, 2020, vol. 7: 11. doi: 10.1186/s40779-020-00240-0
51. Haeggström A., Östberg B., Stjerna P., Graf P., Hallén H. Nasal mucosal swelling and reactivity during a menstrual cycle. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, 2000, vol. 62, no. 1, pp. 39–42. doi: 10.1159/000027713
52. Haist S.A., Wilson J.F., Elam C.L., Blue A.V., Fosson S.E. The effect of gender and age on medical school performance: an important interaction. *Adv. Health Sci. Educ. Theory Pract.*, 2000, vol. 5, no. 3, pp. 197–205. doi: 10.1023/A:1009829611335
53. Hall A.B., Tolonen A.C., Xavier R.J. Human genetic variation and the gut microbiome in disease. *Nat. Rev. Genet.*, 2017, vol. 181, no. 1, pp. 690–699. doi: 10.1038/nrg.2017.63
54. Hall O.J., Limjunyawong N., Vermillion M.S., Robinson D.P., Wohlgemuth N., Pekosz A., Mitzner W., Klein S.L. Progesterone-based therapy protects against influenza by promoting lung repair and recovery in females. *PLoS Pathog.*, 2016, vol. 12, no. 9: e1005840. doi: 10.1371/journal.ppat.1005840
55. Harmer D., Gilbert M., Borman R., Clark K.L. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett.*, 2002, vol. 532, no. 1–2, pp. 107–110. doi: 10.1016/s0014-5793(02)03640-2
56. Hashimoto T., Perlot T., Rehman A., Trichereau J., Ishiguro H., Paolino M., Sigl V., Hanada T., Hanada R., Lipinski S., Wild B., Camargo S.M., Singer D., Richter A., Kuba K., Fukamizu A., Schreiber S., Clevers H., Verrey F., Rosenstiel P., Penninger J.M. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature*, 2012, vol. 487, no. 7408, pp. 77–81. doi: 10.1038/nature11228
57. Hassanzadeh K., Perez Pena H., Dragotto J., Buccarello L., Iorio F., Pieraccini S., Sancini G., Feligioni M. Considerations around the SARS-CoV-2 Spike Protein with particular attention to COVID-19 brain infection and neurological symptoms. *ACS Chem. Neurosci.*, 2020, vol. 11, no. 15, pp. 2361–2369. doi: 10.1021/acchemneuro.0c00373
58. He J., Wu B., Chen Y., Tang J., Liu Q., Zhou S., Chen C., Qin Q., Huang K., Lv J., Chen Y., Peng D. Characteristic ECG manifestations in patients with COVID-19. *Can. J. Cardiol.*, 2020, vol. 36, no. 6, pp. 966.e1–966.e4. doi: 10.1016/j.cjca.2020.03.028
59. Hill-Burns E.M., Clark A.G. X-linked variation in immune response in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 2009, vol. 183, no. 4, pp. 1477–1491. doi: 10.1534/genetics.108.093971
60. Hirsch J.S., Ng J.H., Ross D.W., Sharma P., Shah H.H., Barnett R.L., Hazzan A.D., Fishbane S., Jhaveri KD; Northwell COVID-19 Research Consortium; Northwell Nephrology COVID-19 Research Consortium. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. *Kidney Int.*, 2020, vol. 98, no. 1, pp. 209–218. doi: 10.1016/j.kint.2020.05.006
61. Hu X., Pan X., Zhou W., Gu X., Shen F., Yang B., Hu Zh. Clinical epidemiological analyses of overweight/obesity and abnormal liver function contributing to prolonged hospitalization in patients infected with COVID-19. *Int. J. Obes.*, 2020, vol. 44, pp. 1784–1789. doi: 10.1038/s41366-020-0634-3
62. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10223, pp. 497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
63. Jain S., Workman V., Ganeshan R., Obasare E.R., Burr A., DeBiasi R.M., Freeman J.V., Akar J., Lampert R., Rosenfeld L.E. Enhanced electrocardiographic monitoring of patients with coronavirus disease 2019. *Heart Rhythm.*, 2020, vol. 17, no. 9, pp. 1417–1422. doi: 10.1016/j.hrthm.2020.04.047
64. Jefferson J.A., Nelson P.J., Najafian B., Shankland S.J. Podocyte disorders: core curriculum 2011. *Am. J. Kidney Dis.*, 2011, vol. 58, no. 4, pp. 666–677. doi: 10.1053/j.ajkd.2011.05.032
65. Ji H., Menini S., Zheng W., Pesce C., Wu X., Sandberg K. Role of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin (1–7) in 17 $\beta$ -oestradiol regulation of renal pathology in renal wrap hypertension in rats. *Exp. Physiol.*, 2008, vol. 93, no. 5, pp. 648–657. doi: 10.1113/expphysiol.2007.041392
66. Jin J.M., Bai P., He W., Wu F., Han D.M., Liu S., Yang J.K. Gender differences in patients with COVID-19: Focus on severity and mortality. *Front. Public Health.*, 2020, vol. 8: 152. doi: 10.3389/fpubh.2020.00152
67. Jordan R.E., Adab P., Cheng K. COVID-19: risk factors for severe disease and death. *BMJ*, 2020, vol. 368: m1198. doi: 10.1136/bmj.m1198

68. Joyner J., Neves L.A., Granger J.P., Alexander B.T., Merrill D.C., Chappell M.C., Ferrario C.M., Davis W.P., Brosnihan K.B. Temporal-spatial expression of ANG-(1-7) and angiotensin-converting enzyme 2 in the kidney of normal and hypertensive pregnant rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2007, vol. 293, no. 1, pp. 169–177. doi: 10.1152/ajpregu.00387.2006
69. Karaahmet F., Karaahmet O.Z. Potential effect of natural and anabolizan steroids in elderly patient with COVID-19. *Med. Hypotheses*. 2020, vol. 140: 109772. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109772
70. Kelly D.M., Jones T.H. Testosterone: a vascular hormone in health and disease. *J. Endocrinol.*, 2013, vol. 217, no. 3, pp. 47–71. doi: 10.1530/JOE-12-0582
71. Kissling S., Rotman S., Gerber C., Halfon M., Lamoth F., Comte D., Lhopitallier L., Sadallah S., Fakhouri F. Collapsing glomerulopathy in a COVID-19 patient. *Kidney Int.*, 2020, vol. 98, no. 1, pp. 228–231. doi: 10.1016/j.kint.2020.04.006
72. Klein S.L., Dhakal S., Ursin R.L., Deshpande S., Sandberg K., Mauvais-Jarvis F. Biological sex impacts COVID-19 outcomes. *PLoS Pathog.*, 2020, vol. 16, no. 6: e1008570. doi: 10.1371/journal.ppat.1008570
73. Kuba K., Imai Y., Rao S., Gao H., Guo F., Guan B., Huan Y., Yang P., Zhang Y., Deng W., Bao L., Zhang B., Liu G., Wang Z., Chappell M., Liu Y., Zheng D., Leibbrandt A., Wada T., Slutsky A.S., Liu D., Qin C., Jiang C., Penninger J.M. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.*, 2005, vol. 11, no. 8, pp. 875–879. doi: 10.1038/nm1267
74. Kypreos K.E., Zafirovic S., Petropoulou P.I., Bjelogrić P., Resanovic I., Traish A., Isenovic E.R. Regulation of endothelial nitric oxide synthase and high-density lipoprotein quality by estradiol in cardiovascular pathology. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, 2014, vol. 19, no. 3, pp. 256–268. doi: 10.1177/1074248413513499
75. Larsen C., Bourne T., Wilson J., Saqqa O., Sharshir M. Collapsing glomerulopathy in a patient with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Kidney Int. Rep.*, 2020, vol. 5, no. 6, pp. 935–939. doi: 10.1016/j.ekir.2020.04.002
76. Leung W.K., To K.F., Chan P.K., Chan H.L., Wu A.K., Lee N., Yuen K.Y., Sung J.J. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology*, 2003, vol. 125, no. 4, pp. 1011–1017. doi: 10.1016/s0016-5085(03)01215-0
77. Li H., Liu Z., Gou Y., Yu H., Siminelakis S., Wang S., Kong D., Zhou Y., Liu Z., Ding Y., Yao D. Estradiol mediates vasculo-protection via ERR $\alpha$ -dependent regulation of lipid and ROS metabolism in the endothelium. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 2015, vol. 87, pp. 92–101. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.08.008
78. Li Y.C., Bai W.Z., Hashikawa T. The neuroinvasive potential of SARS-CoV-2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 6, pp. 552–555. doi: 10.1002/jmv.25728
79. Li Y., Li H., Fan R., Wen B., Zhang J., Cao X., Wang C., Song Z., Li S., Li X., Lv X., Qu X., Huang R., Liu W. Coronavirus infections in the central nervous system and respiratory tract show distinct features in hospitalized children. *Intervirology*, 2016, vol. 59, no. 3, pp. 163–169. doi: 10.1159/000453066
80. Libert C., Dejager L., Pinheiro I. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, vol. 10, no. 8, pp. 594–604. doi: 10.1038/nri2815
81. Liu J., Ji H., Zheng W., Wu X., Zhu J.J., Arnold A.P., Sandberg K. Sex differences in renal angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) activity are 17 $\beta$ -oestradiol-dependent and sex chromosome-independent. *Biol. Sex Differ.*, 2010, vol. 1: 6. doi: 10.1186/2042-6410-1-6
82. Looft T., Allen H.K. Collateral effects of antibiotics on mammalian gut microbiomes. *Gut Microbes.*, 2012, vol. 3, no. 5, pp. 463–467. doi: 10.4161/gmic.21288
83. Maggio M., Basaria S., Ceda G.P., Ble A., Ling S.M., Bandinelli S., Valenti G., Ferrucci L. The relationship between testosterone and molecular markers of inflammation in older men. *J. Endocrinol. Invest.*, 2005, vol. 28, no. 11, pp. 116–119.
84. Magro C., Mulvey J.J., Berlin D., Nuovo G., Salvatore S., Harp J., Baxter-Stoltzfus A., Laurence J. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: a report of five cases. *Transl. Res.*, 2020, vol. 220, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.trsl.2020.04.007
85. Maleki Dana P., Sadoughi F., Hallajzadeh J., Asemi Z., Mansournia M.A., Yousefi B., Momen-Heravi M. An insight into the sex differences in COVID-19 patients: what are the possible causes? *Prehosp. Disaster Med.*, 2020, pp. 1–4. doi: 10.1017/S1049023X20000837
86. Mantovani A., Beatrice G., Dalbeni A. Coronavirus disease 2019 and prevalence of chronic liver disease: A meta-analysis. *Liver Intern.*, 2020, vol. 40, no. 6, pp. 1316–1320. doi: 10.1111/liv.14465
87. Mao L., Jin H., Wang M., Hu Y., Chen S., He Q., Chang J., Hong C., Zhou Y., Wang D., Miao X., Li Y., Hu B. Neurological manifestations of hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective case series study. *JAMA Neurol.*, 2020, vol. 77, no. 6, pp. 683–690. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.1127
88. Mauvais-Jarvis F., Klein S.L., Levin E.R. Estradiol, progesterone, immunomodulation, and COVID-19 outcomes. *Endocrinol.*, 2020, vol. 161, no. 9: bqaa127. doi: 10.1210/endo/bqaa127
89. McGonagle D., O'Donnell J.S., Sharif K., Emery P., Bridgewood C. Immune mechanisms of pulmonary intravascular coagulopathy in COVID-19 pneumonia. *Lancet Rheumatol.*, 2020, vol. 2, no. 7, pp. 437–445. doi: 10.1016/S2665-9913(20)30121-1
90. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J.; HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet (Lond.)*, 2020, vol. 395 no. 10229, pp. 1033–1034. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0
91. Meng Y., Wu P., Lu W., Liu K., Ma K., Huang L., Cai J., Zhang H., Qin Y., Sun H., Ding W., Gui L., Wu P. Sex-specific clinical characteristics and prognosis of coronavirus disease-19 infection in Wuhan, China: a retrospective study of 168 severe patients. *PLoS Pathog.*, 2020, vol. 16, no. 4: e1008520. doi: 10.1371/journal.ppat.1008520
92. Mikkelsen K., Stojanovska L., Polenakovic M., Bosevski M., Apostolopoulos V. Exercise and mental health. *Maturitas*. 2017, vol. 106, pp. 48–56. doi: 10.1016/j.maturitas.2017.09.003
93. Miller V., Larosa J., Barnabei V., Kessler C., Levin G., Smith-Roth A., Griffin M., Stoy D.B., Bush T., Zacur H., Foster D., Anderson J., McKenzie A., Miller S.C., Wood P., Stefanick M., Marcus R., Akana A., Heinrichs W., Kirchner C., O'Hanlan K., Ruyle M., Sheehan M., Judd H., Greendale G., Bayalos R., Lozano K., Kawakami K., Barrett-Connor E., Langer R., Kritz-

- Silverstein D., Carrion-Petersen M., Cavero C., Schrott H., Johnson S.R., Feddersen D., Krutzfeldt D.L., Benda J., Pauerstein C., Trabal J., Schenken R., Stern M., Rodriguez-Sifuentes M., Easton C., Hb W., Espeland M., Howard G., Byington R., Legault C., Shumaker S., Hogan P., Hire D., Wasilauskas C., James M.K., Lane K., Terrell T., Reece S., Pierce J., Snow M., Anthony S., Mebane-Sims I., Einhorn P., Hunsberger S., Waclawiw M., Lippel K., Lucas D.L., Verter J., Jackson S., Kelaghan J., Perlman J., Wolf P., McGowan J., Gordon S., Heyse S., Fradkin J., Sherman S., Page L., Sorenson A., Hulka B., Brody B., Burkman R., Heaney R., Krauss R., Roberts H., Wittes J., Riggs L., Moss R., Albers J., Marcovina S., Fineberg S., Tracy R., Merino M., Scully R., Livolsi V., Kessler G. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *JAMA*, 1995, vol. 273, no. 3, pp. 199–208. doi: 10.1001/jama.1995.03520270033028
94. Mingels A.M.A., Kimenai D.M. Sex-related aspects of biomarkers in cardiac disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2018, vol. 1065, pp. 545–564. doi: 10.1007/978-3-319-77932-4\_33
  95. Mizuguchi M., Yamanouchi H., Ichiyama T., Shiomi M. Acute encephalopathy associated with influenza and other viral infections. *Acta Neurol. Scand. Suppl.*, 2007, vol. 115, pp. 45–56.
  96. Mohamad N.V., Wong S.K., Wan Hasan W.N., Jolly J.J., Nur-Farhana M.F., Ima-Nirwana S., Chin K.Y. The relationship between circulating testosterone and inflammatory cytokines in men. *Aging Male*, 2019, vol. 22, no. 2, pp. 129–140. doi: 10.1080/13685538.2018.1482487
  97. Moieni M., Muscatell K.A., Jevtic I., Breen E.C., Irwin M.R., Eisenberger N.I. Sex differences in the effect of inflammation on subjective social status: a randomized controlled trial of endotoxin in healthy young adults. *Front. Psychol.*, 2019: 02167. doi: 10.3389/fpsyg.2019.02167
  98. Moreau K.L. Intersection between gonadal function and vascular aging in women. *J. Appl. Physiol. (1985)*, 2018, vol. 125, no. 12, pp. 1881–1887. doi: 10.1152/jappphysiol.00117.2018
  99. Moriguchi T., Harii N., Goto J., Harada D., Sugawara H., Takamino J., Ueno M., Sakata H., Kondo K., Myose N., Nakao A., Takeda M., Haro H., Inoue O., Suzuki-Inoue K., Kubokawa K., Ogihara S., Sasaki T., Kinouchi H., Kojin H., Ito M., Onishi H., Shimizu T., Sasaki Y., Enomoto N., Ishihara H., Furuya S., Yamamoto T., Shimada S. A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 94, pp. 55–58. doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.062
  100. Mosca A., Leclerc M., Hugot J.P. Gut microbiota diversity and human diseases: should we reintroduce key predators in our ecosystem? *Front. Microbiol.*, 2016, vol. 7: 455. doi: 10.3389/fmicb.2016.00455
  101. Muhammad S., Haasbach E., Kotchourko M., Strigli A., Krenz A., Ridder D.A., Vogel A.B., Marti H.H., Al-Abed Y., Planz O., Schwaninger M. Influenza virus infection aggravates stroke outcome. *Stroke*, 2011, vol. 42, no. 3, pp. 783–791. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.596783
  102. Nettleship J., Jones R., Channer K., Jones T. Testosterone and coronary artery disease. Advances in the management of testosterone deficiency. *Front. Horm. Res. Basel, Karger*, 2009, vol. 37, pp. 91–107. doi: 10.1159/000176047
  103. Nichols B., Jog P., Lee J.H., Blackler D., Wilmot M., D'Agati V., Markowitz G., Kopp J.B., Alper S.L., Pollak M.R., Friedman D.J. Innate immunity pathways regulate the nephropathy gene apolipoprotein L1. *Kidney Int.*, 2015, vol. 87, no. 2, pp. 332–342. doi: 10.1038/ki.2014.270
  104. Oudit G.Y., Kassiri Z., Jiang C., Liu P.P., Poutanen S.M., Penninger J.M., Butany J. SARS-coronavirus modulation of myocardial ACE2 expression and inflammation in patients with SARS. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2009, vol. 39, no. 7, pp. 618–625. doi: 10.1111/j.1365-2362.2009.02153.x
  105. Papadopoulos V., Li L., Samplaski M. Why does COVID-19 kill more elderly men than women? Is there a role for testosterone? *Andrology*, 2021, vol. 9, no. 1, pp. 65–72. doi: 10.1111/andr.12868
  106. Peleg Y., Kudose S., D'Agati V., Siddall E., Ahmad S., Nickolas T., Kisselev S., Gharavi A., Canetta P. Acute kidney injury due to collapsing glomerulopathy following COVID-19 infection. *Kidney Int. Rep.*, 2020, vol. 5, no. 6, pp. 940–945. doi: 10.1016/j.ekir.2020.04.017
  107. Phiel K.L., Henderson R.A., Adelman S.J., Elloso M.M. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol. Lett.*, 2005, vol. 97, no. 1, pp. 107–113. doi: 10.1016/j.imlet.2004.10.007
  108. Piccinni M.P., Giudizi M.G., Biagiotti R., Beloni L., Giannarini L., Sampognaro S., Parronchi P., Manetti R., Annunziato F., Livi C. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J. Immunol.*, 1995, vol. 155, no. 1, pp. 128–133.
  109. Pinzon R.T., Wijaya V.O., Buana R.B., Al Jody A., Nunsio P.N. Neurologic characteristics in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systematic review and meta-analysis. *Front. Neurol.*, 2020, vol. 11: 565. doi: 10.3389/fneur.2020.00565
  110. Pirola C.J., Sookoian S.C. COVID-19 and ACE2 in the liver and gastrointestinal tract: Putative biological explanations of sexual dimorphism. *Gastroenterology*, 2020, vol. 159, no. 4, pp. 1620–1621. doi: 10.1053/j.gastro.2020.04.050
  111. Pisitkun P., Deane J.A., Difilippantonio M.J., Tarasenko T., Satterthwaite A.B., Bolland S. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science*, 2006, vol. 312, no. 5780, pp. 1669–1672. doi: 10.1126/science.1124978
  112. Poyiadji N., Shahin G., Noujaim D., Stone M., Patel S., Griffith B. COVID-19-associated acute hemorrhagic necrotizing encephalopathy: CT and MRI features. *Radiology*, 2020, vol. 296, no. 2, pp. E119–E120. doi: 10.1148/radiol.2020201187
  113. Regitz-Zagrosek V., Oertelt-Prigione S., Seeland U., Hetzer R. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Circ. J.*, 2010, vol. 74, no. 7, pp. 1265–1273. doi: 10.1253/circj.cj-10-0196
  114. Rettew J.A., Huet-Hudson Y.M., Marriott I. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biol. Reprod.*, 2008, vol. 78, no. 3, pp. 432–437. doi: 10.1095/biolreprod.107.06354
  115. Romero-Sánchez C.M., Díaz-Maroto I., Fernández-Díaz E., Sánchez-Larsen A., Layos-Romero A., García-García J., González E., Redondo-Peñas I., Perona-Moratalla A.B., Del Valle-Pérez J.A., Gracia-Gil J., Rojas-Bartolomé L., Feria-Vilar I., Monteagudo M., Palao M., Palazón-García E., Alcahut-Rodríguez C., Sopelana-Garay D., Moreno Y., Ahmad J., Segura T. Neurologic manifestations in hospitalized patients with COVID-19: The ALBACOVID registry. *Neurology*, 2020, vol. 95, no. 8, pp. 1060–1070. doi: 10.1212/WNL.0000000000009937

116. Ronco C., Reis T. Kidney involvement in COVID-19 and rationale for extracorporeal therapies. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2020, vol. 16, pp. 308–310. doi: 10.1038/s41581-020-0284-7
117. Ronco C., Reis T., Husain-Syed F. Management of acute kidney injury in patients with COVID-19. *Lancet Respir. Med.*, 2020, vol. 8, no. 7, pp. 738–742. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30229-0
118. Rossi A. Imaging of acute disseminated encephalomyelitis. *Neuroimaging Clin. N. Am.*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 149–161. doi: 10.1016/j.nic.2007.12.007
119. Ruan Q., Yang K., Wang W., Jiang L., Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.*, 2020, vol. 46, no. 5, pp. 846–848. doi: 10.1007/s00134-020-05991-x
120. Santos R.A.S., Sampaio W.O., Alzamora A.C., Motta-Santos D., Alenina N., Bader M., Campagnole-Santos M.J. The ACE2/angiotensin-(1–7)/MAS axis of the renin-angiotensin system: focus on angiotensin-(1–7). *Physiol. Rev.*, 2018, vol. 98, no. 1, pp. 505–553. doi: 10.1152/physrev.00023.2016
121. Sarkaki A.R., Khaksari H.M., Soltani Z., Shahrokhi N., Mahmoodi M. Time- and dose-dependent neuroprotective effects of sex steroid hormones on inflammatory cytokines after a traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.*, 2013, vol. 30, no. 1, pp. 47–54. doi: 10.1089/neu.2010.1686
122. Seeland U., Regitz-Zagrosek V. Sex and gender differences in pharmacology. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2012, vol. 214, pp. 13–22. doi: 10.1007/978-3-642-30726-3\_1
123. Shenoy V., Grobe J.L., Qi Y., Ferreira A.J., Fraga-Silva R.A., Collamat G., Bruce E., Katovich M.J. 17 $\beta$ -Estradiol modulates local cardiac renin-angiotensin system to prevent cardiac remodeling in the DOCA-salt model of hypertension in rats. *Peptides*, 2009, vol. 30, no. 12, pp. 2309–2315. doi: 10.1016/j.peptides.2009.09.005
124. Shi S., Qin M., Shen B., Cai Y., Liu T., Yang F., Gong W., Liu X., Liang J., Zhao Q., Huang H., Yang B., Huang C. Association of cardiac injury with mortality in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiology*, 2020, vol. 5, no. 7, pp. 802–810. doi: 10.1001/jamacardio.2020.0950
125. Siddiqi H.K., Mehra M.R. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: a clinical–therapeutic staging proposal. *J. Heart Lung Transplant.*, 2020, vol. 39, no. 5, pp. 405–407. doi: 10.1016/j.healun.2020.03.012
126. Sierpiński R., Pinkas J., Jankowski M., Zgliczyński W.S., Wierzbza W., Gujski M., Szumowski Ł. Gender differences in the frequency of gastrointestinal symptoms and olfactory or taste disorders among 1942 non-hospitalized patients with COVID-19. *Pol. Arch. Intern. Med.*, 2020, vol. 130, no. 6, pp. 501–505. doi: 10.20452/pamw.15414
127. Simonnet A., Chetboun M., Poissy J., Raverdy V., Noulette J., Duhamel A., Labreuche J., Mathieu D., Pattou F., Jourdain M; LICORN and the Lille COVID-19 and Obesity study group. High prevalence of obesity in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) requiring invasive mechanical ventilation. *Obesity*, 2020, vol. 28, no. 7, pp. 1195–1199. doi: 10.1002/oby.22831
128. Soltani Z., Shahrokhi N., Karamouzian S., Khaksari M., Mofid B., Nakhaee N., Reihani H. Does progesterone improve outcome in diffuse axonal injury? *Brain Inj.*, 2017, vol. 31, no. 1, pp. 16–23. doi: 10.1080/02699052.2016.1213421
129. Spagnolo P.A., Manson J.E., Joffe H. Sex and gender differences in health: What the COVID-19 pandemic can teach us. *Ann. Intern. Med.*, 2020, vol. 173, no. 5, pp. 385–386. doi: 10.7326/M20-1941
130. Stanhewicz A.E., Wenner M.M., Stachenfeld N.S. Sex differences in endothelial function important to vascular health and overall cardiovascular disease risk across the lifespan. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2018, vol. 315, no. 6, pp. 1569–1588. doi: 10.1152/ajpheart.00396.2018
131. Stelzig K.E., Canepa-Escaro F., Schiliro M., Berdnikovs S., Prakash Y., Chiarella S.E. Estrogen regulates the expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2 in differentiated airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2020, vol. 318, no. 6, pp. 1280–1281. doi: 10.1152/ajplung.00153.2020
132. Straub R.H. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine Rev.*, 2007, vol. 28, no. 5, pp. 521–574. doi: 10.1210/er.2007-0001
133. Su H., Yang M., Wan C., Yi L.X., Tang F., Zhu H.Y., Yi F., Yang H.C., Fogo A.B., Nie X., Zhang C. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int.*, 2020, vol. 98, no. 1, pp. 219–227. doi: 10.1016/j.kint.2020.04.003
134. Suba Z. Prevention and therapy of COVID-19 via exogenous estrogen treatment for both male and female patients. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2020, vol. 23, no. 1, pp. 75–85. doi: 10.18433/jpps31069
135. Szekeres-Bartho J., Wegmann T. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1Th2 balance. *J. Reprod. Immunol.*, 1996, vol. 31, no. 1–2, pp. 81–95. doi: 10.1016/0165-0378(96)00964-3
136. Tam A., Wadsworth S., Dorscheid D., Man S.-F.P., Sin D.D. Estradiol increases mucus synthesis in bronchial epithelial cells. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 6: e100633. doi: 10.1371/journal.pone.0100633
137. Taneja V. Sex hormones determine immune response. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 1931. doi: 10.3389/fimmu.2018.01931
138. Tauber S.C., Eiffert H., Brück W., Nau R. Septic encephalopathy and septic encephalitis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2017, vol. 15, no. 2, pp. 121–132. doi: 10.1080/14787210.2017.1265448
139. Tisoncik J.R., Korth M.J., Simmons C.P., Farrar J., Martin T.R., Katze M.G. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2012, vol. 76, no. 1, pp. 26–32. doi: 10.1128/MMBR.05015-11
140. Toljan K. Letter to the editor regarding the viewpoint “Evidence of the COVID-19 virus targeting the CNS: tissue distribution, host–virus interaction, and proposed neurotropic mechanism”. *ACS Chem. Neurosci.*, 2020, vol. 11, no. 8, pp. 1192–1194. doi: 10.1021/acscchemneuro.0c00174
141. Topozada H., Topozada M., El-Ghazzawi I., Elwany S. The human respiratory nasal mucosa in females using contraceptive pills: an ultramicroscopic and histochemical study. *J. Laryngol. Otol.*, 1984, vol. 98, no. 1, pp. 43–51. doi: 10.1017/s002221510014616x
142. Tukiainen T., Villani A.C., Yen A., Rivas M.A., Marshall J.L., Satija R., Aguirre M., Gauthier L., Fleharty M., Kirby A., Cummings B.B., Castel S.E., Karczewski K.J., Aguet F., Byrnes A; GTEx Consortium; Laboratory, Data Analysis & Coordinating Center (LDACC)—Analysis Working Group; Statistical Methods groups—Analysis Working Group; Enhancing GTEx (eGTEx) groups; NIH Common Fund; NIH/NCI; NIH/NHGRI; NIH/NIMH; NIH/NIDA; Biospecimen Collection Source Site—

- NDRI; Biospecimen Collection Source Site—RPCI; Biospecimen Core Resource—VARI; Brain Bank Repository—University of Miami Brain Endowment Bank; Leidos Biomedical—Project Management; ELSI Study; Genome Browser Data Integration & Visualization—EBI; Genome Browser Data Integration & Visualization—UCSC Genomics Institute, University of California Santa Cruz, Lappalainen T., Regev A., Ardlie K.G., Hacohen N., MacArthur D.G. Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. *Nature*, 2017, vol. 550, no. 7675, pp. 244–248. doi: 10.1038/nature24265
143. Turner A.J., Hiscox J.A., Hooper N.M. ACE2: from vasoepitidase to SARS virus receptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2004, vol. 25, no. 6, pp. 291–294. doi: 10.1016/j.tips.2004.04.001
  144. Varga Z., Flammer A.J., Steiger P., Haberecker M., Andermatt R., Zinkernagel A.S., Mehra M.R., Schuepbach R.A., Ruschitzka F., Moch H. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10234, pp. 1417–1418. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5
  145. Vermillion M.S., Ursin R.L., Kuok D.I.T., Vom Steeg L.G., Wohlgenuth N., Hall O.J., Fink A.L., Sasse E., Nelson A., Ndeh R., McGrath-Morrow S., Mitzner W., Chan M.C.W., Pekosz A., Klein S.L. Production of amphiregulin and recovery from influenza is greater in males than females. *Biol. Sex Differ.*, 2018, vol. 9: 24. doi: 10.1186/s13293-018-0184-8
  146. Voigt R.M., Forsyth C.B., Green S.J., Mutlu E., Engen P., Vitaterna M.H., Turek F.W., Keshavarzian A. Circadian disorganization alters intestinal microbiota. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 5: e97500. doi: 10.1371/journal.pone.0097500
  147. Vom Steeg L.G., Klein S.L. SeXX matters in infectious disease pathogenesis. *PLoS Pathog.*, 2016, vol. 12, no. 2: e1005374. doi: 10.1371/journal.ppat.1005374
  148. Wang D., Hu B., Hu C., Zhu F., Liu X., Zhang J., Wang B., Xiang H., Cheng Z., Xiong Y., Zhao Y., Li Y., Wang X., Peng Z. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 2020, vol. 323, no. 11, pp. 1061–1069. doi: 10.1001/jama.2020.1585
  149. Wang S., Han P., Xiao F. Manifestations of liver injury in 333 hospitalized patients with coronavirus disease 2019. *Chinese J. Digest.*, 2020, vol. 40, no. 00: E008. doi: 10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2020.0008
  150. Warren-Gash C., Blackburn R., Whitaker H., McMenamin J, Hayward A.C. Laboratory-confirmed respiratory infections as triggers for acute myocardial infarction and stroke: a self-controlled case series analysis of national linked datasets from Scotland. *Eur. Respir. J.*, 2018, vol. 513, no. 1: 701794. doi: 10.1183/13993003.01794-2017
  151. Lv D., Qin C., Gu D., Zhang B., Chen W., Hou J., Song N., Zeng G., Ren S. Sex differences in severity and mortality among patients with COVID-19: evidence from pooled literature analysis and insights from integrated bioinformatic analysis. *ArXiv*, 2020. doi: 2003.13547
  152. WHO. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. URL: <https://covid19.who.int/>
  153. Wong S.H., Lui R.N., Sung J.J. COVID19 and the digestive system. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2020, vol. 35, no. 5, pp. 744–748. doi: 10.1111/jgh.15047
  154. Wu Y., Xu X., Chen Z., Duan J., Hashimoto K., Yang L., Liu C., Yang C. Nervous system involvement after infection with COVID-19 and other coronaviruses. *Brain Behav. Immun.*, 2020, vol. 87, pp. 18–22. doi: 10.1016/j.bbi.2020.03.031
  155. Xia H., Lazartigues E. Angiotensin-converting enzyme 2: central regulator for cardiovascular function. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2010, vol. 12, no. 3, pp. 170–175. doi: 10.1007/s11906-010-0105-7
  156. Xiang P., Xu X.M., Gao L.L., Wang H.Z., Xiong H.F., Li R.H. First case of 2019 novel coronavirus disease with Encephalitis. *ChinaXiv*, 2020, vol. 202003: 00015.
  157. Xiao F., Tang M., Zheng X., Liu Y., Li X., Shan H. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology*, 2020, vol. 158, no. 6, pp. 1831–1833. doi: 10.1053/j.gastro.2020.02.055
  158. Xu Y., Li X., Zhu B., Liang H., Fang C., Gong Y., Guo Q., Sun X., Zhao D., Shen J., Zhang H., Liu H., Xia H., Tang J., Zhang K., Gong S. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nat. Med.*, 2020, vol. 26, no. 4, pp. 502–505. doi: 10.1038/s41591-020-0817-4
  159. Xu Z., Shi L., Wang Y., Zhang J., Huang L., Zhang C., Liu S., Zhao P., Liu H., Zhu L., Tai Y., Bai C., Gao T., Song J., Xia P., Dong J., Zhao J., Wang F.S. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.*, 2020, vol. 8, no. 4, pp. 420–422. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X
  160. Zhang W.C., Kaushal S., Yeo D. Enteric involvement of coronaviruses: is faecal–oral transmission of SARS-CoV-2 possible? *Lancet Gastroenterol. Hepatol.*, 2020, vol. 5, no. 4, pp. 335–337. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30048-0
  161. Young G.B. Encephalopathy of infection and systemic inflammation. *J. Clin. Neurophysiol.*, 2013, vol. 305, no. 4, pp. 454–461. doi: 10.1097/WNP.0b013e3182a73d83
  162. Zhang C., Shi L., Wang F.-S. Liver injury in COVID-19: management and challenges. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.*, 2020, vol. 5, no. 5, pp. 428–430. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30057-1
  163. Zhang H., Kang Z., Gong H., Xu D., Wang J., Li Z., Cui X., Xiao J., Meng T., Zhou W., Liu J., Xu H. The digestive system is a potential route of 2019-nCoV infection: a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes. *BioRxiv*, 2020. doi: 10.1101/2020.01.30.927806
  164. Zhang H., Baker A. Recombinant human ACE2: acing out angiotensin II in ARDS therapy. *Crit. Care*, 2017, vol. 21, no. 1: 305. doi: 10.1186/s13054-017-1882-z
  165. Zhang J., Wang X., Jia X., Li J., Hu K., Chen G., Wei J., Gong Z., Zhou C., Yu H., Yu M., Lei H., Cheng F., Zhang B., Xu Y., Wang G., Dong W. Risk factors for disease severity, unimprovement, and mortality of COVID-19 patients in Wuhan, China. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2020, vol. 26, no. 6, pp. 767–772. doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.012
  166. Zhang W., Du R.H., Li B., Zheng X.S., Yang X.L., Hu B., Wang Y.Y., Xiao G.F., Yan B., Shi Z.L., Zhou P. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, vol. 9, no. 1, pp. 386–389. doi: 10.1080/22221751.2020.1729071
  167. Zhang Y., Xiao M., Zhang S., Xia P., Cao W., Jiang W., Chen H., Ding X., Zhao H., Zhang H., Wang C., Zhao J., Sun X., Tian R., Wu W., Wu D., Ma J., Chen Y., Zhang D., Xie J., Yan X., Zhou X., Liu Z., Wang J., Du B., Qin Y., Gao P., Qin X., Xu Y., Zhang W., Li T., Zhang F., Zhao Y., Li Y., Zhang S. Coagulopathy and antiphospholipid antibodies in patients with COVID-19. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 382: e38. doi: 10.1056/NEJMc2007575

168. Zheng Y.-Y., Ma Y.-T., Zhang J.-Y., Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat. Rev. Cardiol.*, 2020, vol. 17, no. 5, pp. 259–260. doi: 10.1038/s41569-020-0360-5
169. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10229, pp. 1054–1062. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3
170. Zhou Z., Zhao N., Shu Y., Han S., Chen B., Shu X. Effect of gastrointestinal symptoms in patients with COVID-19. *Gastroenterology*, 2020, vol. 158, no. 8, pp. 2294–2297. doi: 10.1053/j.gastro.2020.03.020

**Авторы:**

**Хаксари М.**, д.н., профессор физиологии, Исследовательский центр нейронаук, Институт нейрофармакологии, Керманский университет медицинских наук, г. г. Керман, Иран; Исследовательский центр эндокринологии и метаболизма, Институт фундаментальных и клинических физиологических наук, медицинский факультет, Керманский университет медицинских наук, г. Керман, Иран;

**Сабет Н.**, к.н. (физиология), Исследовательский центр тропических и инфекционных заболеваний, Керманский университет медицинских наук, г. Керман, Иран; Исследовательский центр эндокринологии и метаболизма, Институт фундаментальных и клинических физиологических наук, медицинский факультет, Керманский университет медицинских наук, г. Керман, Иран; старший ассистент, кафедра физиологии и фармакологии медицинского факультета им. А. Афзалипура, Керманский университет медицинских наук, г. Керман, Иран;

**Солтани З.**, д.н., профессор физиологии, Исследовательский центр эндокринологии и метаболизма, Институт фундаментальных и клинических физиологических наук, медицинский факультет, Керманский университет медицинских наук, г. Керман, Иран; Исследовательский центр тропических и инфекционных заболеваний, Керманский университет медицинских наук, г. Керман, Иран; кафедра физиологии и фармакологии, медицинский факультет им. А. Афзалипура, Керманский университет медицинских наук, г. Керман, Иран;

**Башири Х.**, д.н., профессор фармакологии, Научно-исследовательский центр нейронаук, Институт нейрофармакологии, Керманский университет медицинских наук, г. Керман, Иран; медицинский факультет Сирджанского университета медицинских наук, Сирджан, Иран.

**Authors:**

**Khaksari M.**, MD, PhD, Professor of Physiology, Neuroscience Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran; Endocrinology and Metabolism Research Center, Institute of Basic and Clinical Physiology Sciences, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran;

**Sabet N.**, PhD (Physiology), Senior Assistant, Research Center of Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran; Endocrinology and Metabolism Research Center, Institute of Basic and Clinical Physiology Sciences, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran; Department of Physiology and Pharmacology, Afzalipour Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran;

**Soltani Z.**, MD, PhD, Professor of Physiology, Endocrinology and Metabolism Research Center, Institute of Basic and Clinical Physiology Sciences, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran; Research Center of Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran; Department of Physiology and Pharmacology, Afzalipour Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran;

**Bashiri H.**, MD, PhD, Professor of Pharmacology, Neuroscience Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran; Sirjan Faculty of Medicine, Sirjan University of Medical Sciences, Sirjan, Iran.

# СОВРЕМЕННОЕ РАЗВИТИЕ СХЕМ ЭРАДИКАЦИИ *HELICOBACTER PYLORI*

А.О. Поздеева<sup>1</sup>, О.К. Поздеев<sup>1</sup>, П.Е. Гуляев<sup>2</sup>, Ю.В. Валеева<sup>3</sup>, А.Н. Савинова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанская государственная медицинская академия — филиал РМАНПО МЗ РФ, г. Казань, Россия

<sup>2</sup> Казанский государственный медицинский университет МЗ РТ, г. Казань, Россия

<sup>3</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия

**Резюме.** *Helicobacter pylori* — один из наиболее распространенных микроорганизмов-комменсалов человека, колонизирующий до 60% жителей всех континентов. Некоторые штаммы *H. pylori* приобрели вирулентные свойства, и их присутствие может существенно осложнять течение атрофического гастрита типа В, язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, а также способствовать развитию злокачественных заболеваний желудка. В подобных ситуациях проведение эрадикационной терапии представляется патогенетически оправданным. Международные рекомендации по проведению стандартной тройной эрадикационной терапии первой линии, включающей ингибитор протонной помпы (ИПП), амоксициллин и кларитромицин курсом в 7–10 дней, были предложены в 1996 г. До начала XXI в. ее активно и с высокой эффективностью (до 90%) применяли повсеместно, однако позднее стали появляться сообщения о катастрофическом снижении результатов подобной схемы лечения (до 60%). Затем выяснилось, что эффективность трехкомпонентной (тройной) терапии прямо коррелирует с резистентностью к кларитромицину, существенно возросшей в последние десятилетия, что вызвало необходимость создания новых схем элиминации хеликобактеров. Были проанализированы результаты различных современных схем эрадикации *H. pylori*, в том числе варианты модифицированной тройной терапии, связанные с включением в схему новых препаратов либо увеличением продолжительности эрадикации: в частности, было предложено заменить амоксициллин на метронидазол. Однако дальнейшие исследования показали, что сочетание кларитромицина с амоксициллином представляется более предпочтительным, что обусловлено высоким уровнем резистентности *H. pylori* к метронидазолу во многих странах. Были проанализированы попытки параллельного применения пробиотиков, в частности культур различных видов *Lactobacillus*. Установлено увеличение уровня эрадикации при проведении стандартной тройной терапии с 61,5 до 81,6%, а также достоверное снижение выраженности побочных эффектов. Показано, что перспективным путем повышения эффективности 7-дневных схем терапии первой линии с кларитромицином является применение современных эффективных ИПП (например, эзомепразола или рабепразола). Рассмотрена схема модифицированной последовательной терапии с заменой кларитромицина на тетрациклин или левофлоксацин, показавшая высокую эффективность. Проанализирован вариант стандартной тройной терапии, модифицированный в квадротерапию дополнением метронидазола или тинидазола. Показано, что схема последовательной терапии неэффективна для эрадикации полирезистентных штаммов. В идеале лечение бактериальных инфекций должно базироваться на проведении эндоскопического забора биоптатов слизистой желудка с последующим микробиологическим определением чувствительности выделенных изолятов к антибактериальным препаратам *in vitro*.

**Ключевые слова:** *Helicobacter pylori*, эрадикационная терапия *Helicobacter pylori*, ингибитор протонной помпы, кларитромицин, левофлоксацин, метронидазол, пробиотики.

---

**Адрес для переписки:**

Валеева Юлия Владимировна  
420008, Россия, г. Казань, ул. Кремлевская, 18,  
Казанский (Приволжский) федеральный университет.  
Тел.: 8 937 611-11-55.  
E-mail: val\_julia@mail.ru

**Contacts:**

Yulia V. Valeeva  
420008, Russian Federation, Kazan, Kremlevskaya str., 18,  
Kazan (Volga Region) Federal University.  
Phone: +7 937 611-11-55.  
E-mail: val\_julia@mail.ru

**Для цитирования:**

Поздеева А.О., Поздеев О.К., Гуляев П.Е., Валеева Ю.В.,  
Савинова А.Н. Современное развитие схем эрадикации *Helicobacter*  
*pylori* // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1037–1049.  
doi: 10.15789/2220-7619-CDO-1679

**Citation:**

Pozdeeva A.O., Pozdeev O.K., Gulyaev P.E., Valeeva Yu.V., Savinova A.N.  
Current development of *Helicobacter pylori* eradication protocols // Russian  
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6,  
pp. 1037–1049. doi: 10.15789/2220-7619-CDO-1679

## CURRENT DEVELOPMENT OF *HELICOBACTER PYLORI* ERADICATION PROTOCOLS

Pozdeeva A.O.<sup>a</sup>, Pozdeev O.K.<sup>a</sup>, Gulyaev P.E.<sup>b</sup>, Valeeva Yu.V.<sup>c</sup>, Savinova A.N.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Kazan State Medical Academy — Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Kazan, Russian Federation

<sup>b</sup> Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

<sup>c</sup> Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russian Federation

**Abstract.** *H. pylori* is one of the most common commensal microorganisms in the human body, colonizing up to 60% of the inhabitants of all continents. Some strains of *H. pylori* have acquired virulent properties and their presence can significantly complicate the course of atrophic gastritis of type B, gastric ulcer and duodenal ulcer, as well as malignant diseases of the stomach. In such situations, eradication therapy seems to be pathogenetically justified. International recommendations for standard first-line triple eradication therapy, including a proton pump inhibitor (PPI), amoxicillin and clarithromycin in a course of 7–10 days, were proposed in 1996. Until the beginning of the XXI century, it was actively and with high efficiency (up to 90%) used everywhere, but later reports began to appear about a catastrophic decrease in results (up to 60%). Then it turned out that the effectiveness of the three-component (triple) therapy directly correlates with the resistance to clarithromycin, which has increased significantly in recent decades, and so necessitated the creation of new *H. pylori* elimination schemes. The results of various schemes for *H. pylori* eradication were analyzed, including variants of modified triple therapy associated with the inclusion of new drugs or an increase in the duration of eradication. In particular, it was proposed to replace amoxicillin with metronidazole. However, further studies have shown that the combination of clarithromycin with amoxicillin seems to be preferable, which is due to the high level of *H. pylori* resistance to metronidazole in many countries. Attempts to use probiotics in parallel, in particular cultures of various *Lactobacillus* species, were analyzed, which increases the level of eradication during standard triple therapy from 61.5 to 81.6%, and also significantly reduces the severity of side effects. It has been shown that a promising way to increase the effectiveness of 7-day first-line therapy schemes with clarithromycin is the use of modern effective PPIs (for example, esomeprazole or rabeprazole). The scheme of modified sequential therapy with the replacement of clarithromycin with tetracycline or levofloxacin, which has shown high efficiency, is considered. A variant of standard triple therapy modified into quadrotherapy with the addition of metronidazole or tinidazole was analyzed. It has been shown that the sequential therapy scheme is ineffective for eradication of multidrug-resistant strains. Ideally, the treatment of bacterial infections should be based on endoscopic sampling of gastric mucosa biopsies, followed by microbiological determination of the sensitivity of the isolated isolates to antibacterial drugs *in vitro*.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, *Helicobacter pylori* eradication therapy, proton pump inhibitor, clarithromycin, levofloxacin, metronidazole, probiotics.

## Введение

*Helicobacter pylori* — один из наиболее распространенных микроорганизмов-комменсалов человека, колонизирующий до 60% жителей всех континентов. В ходе эволюции взаимоотношений с организмом-хозяином и, очевидно, под воздействием пресса антибиотических субстанций некоторые штаммы *H. pylori* приобрели вирулентные свойства, и их присутствие может существенно осложнять течение атрофического гастрита типа В, язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, а также способствовать развитию злокачественных заболеваний желудка. При этом приблизительно 70% лиц, колонизированных *H. pylori*, на протяжении всей жизни являются бессимптомными бактерионосителями, а указанные заболевания регистрируют только у 12–15% инфицированных. Это обстоятельство стало основанием для многочисленных дискуссий, что дало повод определить *H. pylori* как «изменчивый» патоген, способный в зависимости от обстоятельств вести себя либо как симбионт, либо как патогенный микроорганизм [56]. В многочисленных исследованиях показано, что степень риска развития заболе-

ваний зависит от характера взаимоотношений между *H. pylori* и организмом-хозяином, обусловленных как штамм-специфичным набором факторов патогенности микроорганизма, так и комплексом эффекторов, индуцированных у носителя. В подобных ситуациях проведение эрадикационной терапии представляется патогенетически оправданным. Однако двадцать лет применения стандартной тройной терапии привели к значительному снижению ее эффективности, что вызвало необходимость создания новых схем элиминации хеликобактеров.

## Стандартная тройная терапия

Международные рекомендации по проведению тройной эрадикационной терапии первой линии, включающей ингибитор протонной помпы (ИПП), амоксициллин и кларитромицин курсом в 7–10 дней, были предложены в 1996 г. Схема дала положительный результат у 80% пациентов, что было определено как нижняя граница ее эффективности [16]. До начала XXI в. ее активно и с высокой эффективностью (до 90%) применяли повсеместно, однако позднее стали появляться сообщения о ката-

строфическом снижении результатов подобной схемы лечения (до 60%). Затем выяснилось, что эффективность трехкомпонентной (тройной) терапии прямо коррелирует с резистентностью к кларитромицину, существенно возросшей в последние десятилетия [36, 55, 58, 59, 75, 87].

Тем не менее тройная терапия первой линии остается популярной во многих странах и с успехом применяется как стартовая в эрадикации *H. pylori*. Результаты 20 исследований с привлечением более 10 000 пациентов показывают, что при наличии чувствительности к препарату эффективность эрадикации составляет почти 88%, тогда как развитие резистентности к кларитромицину понижает ее до 18,3% [58]. В настоящее время стандартная тройная терапия остается вполне эффективной (более 90%) в регионах, где уровень резистентности к кларитромицину не превышает 10% [17]. Однако широкое применение кларитромицина по различным медицинским показаниям привело к тому, что в европейских странах резистентность варьирует от 0,9% в Голландии до 51% в Испании. В целом за 10 лет (1998–2008 гг.) уровень устойчивости в Европе повысился с 9 до 17,5% [17, 34], а к 2013 г. в ряде стран превысил критические 20% [60]. Аналогичная ситуация сложилась в Азии [7, 38, 47, 73, 93]. В различных странах Южной Америки устойчивость к кларитромицину штаммов *H. pylori* варьирует между 13,6 и 19,5% [37]. К концу XX в. в РФ количество резистентных штаммов *H. pylori* увеличилось более чем в 2 раза и составило 17% [1, 2]. В последние годы отмечается неуклонный рост числа резистентных к кларитромицину штаммов *H. pylori*. В различных регионах страны эти величины существенно варьируют, но максимальные показатели зарегистрированы в центральных мегаполисах России. При этом, по мнению многих авторов, критический уровень — 20% резистентности к кларитромицину — еще не достигнут [4, 6, 80]. Падение эффективности стандартной тройной терапии окончательно подтверждено решением IV Маастрихтского консенсуса. Установлен порог чувствительности к кларитромицину — в регионах, где она превышает или равна 20%, проведение стандартной тройной терапии, скорее всего, будет безуспешным [53]. Более широкий мониторинг резистентности *H. pylori* в РФ ограничивает сложность и стоимость методов, а неоднородность уровней резистентности в различных областях не позволяет с полной уверенностью экстраполировать данные единичных исследований на все регионы. Поэтому, несмотря на сохраняющуюся возможность применения стандартной трехкомпонентной терапии с кларитромицином, в каждом регионе необходимо оценивать эффективность альтер-

нативных схем, независимых от резистентности *H. pylori* к макролидам.

В частности, было предложено заменить амоксициллин на метронидазол. Выбор последнего был обусловлен тем, что сочетание метронидазола и кларитромицина уже изначально обладало довольно высокой эрадикационной активностью. Дополнительное включение в данную схему лечения ИПП повышало ее эффективность на 20%. Это дало основание II Маастрихтскому консенсусу ввести данную схему в терапию первой линии при лечении *H. pylori*-инфекции [55]. Однако дальнейшие исследования показали, что сочетание кларитромицина с амоксициллином представляется более предпочтительным по сравнению с комбинацией кларитромицина с метронидазолом. В первую очередь это обусловлено высоким уровнем резистентности *H. pylori* к метронидазолу во многих странах [17, 34, 60]. Аналогичная ситуация имеет место и в РФ. По результатам исследования, проведенного российской группой по изучению *H. pylori*, после неудачного применения терапии первой линии у 80% пациентов были выделены штаммы, устойчивые к метронидазолу, при этом уровни резистентности к метронидазолу в РФ могут радикально варьировать в различных регионах [1, 2]. Кроме того, рост резистентности к метронидазолу неизбежно приводит к развитию вторичной чувствительности к кларитромицину [9].

Для повышения результатов проводимого лечения в качестве альтернативы тройной терапии предложены различные ее варианты, получившие название модифицированной тройной терапии. Наиболее часто модификации в них связаны с включением новых препаратов либо с увеличением продолжительности эрадикации [23, 37, 65].

Наиболее известным вариантом модифицированной тройной терапии являются схемы с включением фторхинолонов. К настоящему времени получены многочисленные сведения об эффективности тройной терапии с замещением кларитромицина на левофлоксацин в качестве терапии первой линии. Эффективность эрадикации варьировала в пределах 72–96%. Высказано предположение, что подобная схема вполне приемлема в регионах, где уровни резистентности к кларитромицину превышают 15–20%, а устойчивость к фторхинолонам составляет менее 10% [8, 31, 89].

Отдельным направлением модификаций стандартной тройной терапии являются попытки увеличить ее эффективность за счет параллельного применения пробиотиков. Эта проблема активно обсуждается педиатрами, так как именно у детей чаще всего наблюдают появление побочных эффектов эрадикационной терапии, выраженность которых существенно

снижается на фоне применения бактериальных препаратов. Наиболее часто в подобных исследованиях используют культуры различных видов *Lactobacillus*, длительно выживающих в условиях кислого рН желудка. В частности, дополнение стандартной тройной терапии *Lactobacillus casei* DN-114001 повышало эффективность эрадикации *H. pylori* у детей до 84,6% при 61,3% в группе, получавшей стандартное лечение [78]. В другом исследовании показано, что прием лактобактерий увеличивает уровень эрадикации при проведении стандартной тройной терапии с 61,5 до 81,6%, а также снижает выраженность побочных эффектов [20]. В то же время Goldman С. и соавт. (2006) при изучении адьювантного действия коммерческих йогуртов, содержащих *Bifidobacterium animalis* и *Lactobacillus casei*, не выявили существенного их влияния на эффективность тройной терапии [33]. Аналогичные результаты были получены в рандомизированном исследовании двойным слепым методом, проведенном в Польше [79] и Румынии, где в качестве пробиотика использовали *Saccharomyces boulardii* [41]. Наконец, в исследовании Tolone S. и соавт. (2012) пациенты опытной группы параллельно с проведением стандартной тройной терапии получали коммерческий препарат, содержащий *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. casei* subsp. *rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. acidophilus*, *L. sporogenes*, *B. infantis* и *B. longum*. По результатам исследования достоверных различий в эффективности проводимой эрадикационной терапии между обеими группами не было установлено [80]. Тем не менее множество исследований свидетельствуют о том, что дополнение стандартной терапии пробиотиками все же оказывает благоприятное влияние на ее эффективность [4, 5, 6, 49, 61, 94, 95]. Весьма существенным условием является и то, что дополнение эрадикационной терапии пробиотиками достоверно снижает побочные проявления проводимого лечения. Механизмы действия пробиотиков остаются малоизученными, но результаты дополнения ими стандартной тройной терапии открывают новые перспективы для использования данной схемы эрадикации и в дальнейшем, что, впрочем, требует проведения дополнительных исследований.

Приведенные сведения позволяют заключить, что стандартная тройная терапия первой линии, несмотря на снижение эффективности, обусловленной ростом резистентности к кларитромицину и метронидазолу, остается терапией выбора для первичной эрадикации *H. pylori*. Перспективным путем повышения эффективности 7-дневных схем терапии первой линии с кларитромицином является применение современных эффективных ИПП (например, эзомепразола или рабепразола) в больших дозах

(по 40 мг дважды в день), обеспечивающих увеличение эффективности на 8–12% по сравнению с ИПП первых поколений [53].

Увеличение длительности стандартной тройной терапии до 10–14 дней, согласно результатам метаанализа контролируемых исследований, менее оправданно, так как обеспечивает увеличение эффективности лечения лишь на 3–5% [26, 53]. Результаты исследований, проведенных в регионах со сравнительно высокой резистентностью к кларитромицину, достаточно противоречивы. Ряд авторов указывают, что пролонгирование тройной терапии может дать хорошие результаты [10, 22, 25, 43], тогда как исследования, проведенные в Южной Корее и Турции, не выявили серьезных преимуществ данной стратегии [13, 84]. В 2013 г. появилось сообщение о 100% эрадикации *H. pylori* после проведения 14-дневной терапии большими дозами ИПП и кларитромицина пролонгированного действия (Клацида) [72]. Но эти исследования были проведены на пациентах, инфицированных штаммами, не проявляющими резистентность к кларитромицину. Насколько эффективной будет данная схема в условиях высокой устойчивости к антибиотикам, остается неизвестным. Можно полагать, что ее результаты не будут столь впечатляющими, так как другие макролиды пролонгированного действия (азитромицин) способствуют росту резистентности [60]. Азитромицин, очевидно, как и прочие макролиды пролонгированного действия, в высоких концентрациях длительно сохраняется в слизистой и желудочном соке на протяжении нескольких недель после приема. Постепенно содержание антибиотика снижается до субингибирующих концентраций, что может создавать предпосылки для селекции устойчивых штаммов *H. pylori*.

Идея применения фторхинолонов в модифицированной тройной терапии первой линии представляется рискованной, так как это рано или поздно неизбежно приведет к росту устойчивости *H. pylori* к указанной группе препаратов.

## Стандартная последовательная (ступенчатая) терапия

Стандартная последовательная (ступенчатая) терапия представляет собой схему квадротерапии (одновременное применение четырех препаратов) без препаратов висмута. Она является актуальной для стран, где применение препаратов висмута запрещено. Схема разработана в Италии в 2000 г. в качестве альтернативы тройной терапии для преодоления резистентности к кларитромицину и повышения эффективности эрадикации. Данная схема включает применение ИПП и амоксициллина в первые 5 дней и ИПП, кларитромицина и метронидазола (ти-

нидазола) в последующие 5 дней в дозах, используемых в терапии первой линии [20, 76]. В статьях, посвященных анализу достоинств ступенчатой терапии, показано, что превосходство над стандартной тройной терапией обусловлено более эффективной элиминацией кларитромицин-устойчивых штаммов. Предпосылкой для ее создания стали исследования, показавшие, что эффективность терапии второй линии повышается, если в качестве схемы первой линии назначали 14-дневную двойную терапию с ИПП и амоксициллином, а в качестве второй — стандартную 7-дневную тройную терапию с кларитромицином [76]. Исследования, проведенные позднее, также подтвердили превосходство подобной схемы над тройной терапией [42, 81, 86, 96]. В 2007 г. проведено рандомизированное контролируемое сравнительное исследование, показавшее несомненное преимущество 10-дневной последовательной схемы эрадикации кларитромицин-резистентных штаммов перед 10-дневной стандартной тройной терапией (91 и 78% соответственно) [86]. Анализ данных ряда исследований, проведенных в Италии, показал высокую результативность последовательной терапии, превышающую 90%, в том числе среди групп риска по возможному отсутствию эффекта стандартной тройной терапии, обусловленного устойчивостью к кларитромицину и метронидазолу, функциональной диспепсией, курением, отсутствием гена *CagA* у выделенных штаммов *H. pylori* [96]. Анализ 46 рандомизированных клинических испытаний с привлечением 5666 пациентов, ранее не получавших эрадикационную терапию, показал эффективность стандартной последовательной терапии инфицирования *H. pylori*, равную 84,3%. Более того, ее проведение элиминирует 72,8% штаммов бактерий, резистентных к кларитромицину [27]. В рандомизированном исследовании эффективность стандартной последовательной терапии и стандартной тройной терапии в отношении кларитромицин-резистентных штаммов составила 89 и 29% соответственно [86]. Механизмы эффективности последовательной терапии в эрадикации кларитромицин-резистентных штаммов *H. pylori* требуют дальнейшего изучения. Предположительно, первичный прием амоксициллина повреждает клеточную стенку, что препятствует организации каналов для эффлюкса кларитромицина, обеспечивающих быстрое выведение его из бактериальной клетки. Схема последовательной терапии была признана одним из наиболее перспективных режимов эрадикации *H. pylori* Американской коллегией руководств по гастроэнтерологии (2007) [12], а также III Маастрихтским консенсусом [54] и II Азиатско-Тихоокеанским консенсусом (2009) [24].

Однако в последние годы появились сведения, ставящие под сомнение преимущества последовательной терапии. В частности, выявлены недостатки предшествующих метаанализов, отсутствие исследований, проведенных за пределами Италии, низкое их качество и недостаток информации относительно элиминации резистентных штаммов *H. pylori* [32, 70]. В многоцентровом исследовании, проведенном в Латинской Америке, показано, что 14-дневная тройная терапия была более эффективна, чем 10-дневная последовательная схема лечения [37]. По данным Choi W.H. и соавт. (2008), сравнение двух схем эрадикации, проведенное в Южной Корее, показало их эффективность, равную 86 и 77% соответственно, что не достигало границ статистической достоверности [14]. В аналогичном исследовании, проведенном в Тайване, сравнивали эффективность 14-дневной тройной терапии, включающей применение ингибитора протонной помпы в больших дозах, с 10- и 14-дневными курсами последовательной терапии. Наименее оптимальным оказалось назначение 10-дневной последовательной терапии. При наличии 9% резистентности к кларитромицину ее эффективность не превышала 90% [50]. Указанное ставит под сомнение возможность применения последовательной терапии в регионах, где высоки уровни устойчивости к кларитромицину и метронидазолу.

Исследования, проведенные в 2008–2012 гг. в Азии, Европе и Латинской Америке, подтвердили преимущества последовательной терапии перед стандартной тройной схемой, но эффективность эрадикации снизилась на 15% (79–81%) в сравнении с результатами, ранее полученными в Италии. Похожие результаты были получены в 2012–2013 г. в исследованиях, проведенных в группах взрослых и детей [39, 44, 98]. Метаанализ, проведенный авторами и разработчиками схемы последовательной терапии, показал ее преимущества перед 7-дневной тройной схемой, но эти преимущества не были статистически достоверными при сравнении с 10-дневной тройной схемой. Более того, последовательная терапия не имела никаких преимуществ перед 14-дневной тройной схемой (2013). По сей день нет оснований рассматривать схему последовательной терапии как оптимальную в преодолении антибиотикорезистентности, и неудачи при ее применении вполне прогнозируемы в эрадикации полирезистентных штаммов, если их уровень превысит 5% [35]. В РФ имеется небольшой опыт применения последовательной терапии (Санкт-Петербург) с эффективностью эрадикации, равной 96%, что требует проведения широкомасштабных исследований для уточнения ее региональной эффективности [3].

Проведенный анализ позволяет заключить, что ступенчатая терапия не имеет особых преимуществ перед пролонгированными курсами, проводимыми по тройным схемам. В то же время результаты многочисленных сравнительных исследований показали ее несомненное превосходство перед укороченными (7-дневными) курсами тройной терапии. Можно полагать, что в присутствии кларитромицин-резистентных штаммов она также не будет иметь особых преимуществ. Кроме того, обращает на себя внимание отсутствие исследований с включением в схемы лечения метронидазола. Анализ эффективности ступенчатой терапии показывает, что она практически равна таковой у 14-дневной тройной терапии и аналогичной схемы с включением препаратов висмута.

### Модифицированная последовательная терапия

В последние годы появились исследования по успешной замене кларитромицина другими антибактериальными препаратами в схемах последовательной терапии. Проведенный сравнительный анализ шести исследований показал эффективность последовательной терапии с включением тетрациклина. Уровни эрадикации варьировали в пределах 50,0–87,9% [97]. При этом замещение тройной терапии на квадротерапию во второй фазе 5-дневного цикла не оказывало существенного влияния на ее эффективность, и уровень эрадикации составлял в среднем 78,5% [11]. В трех исследованиях, проведенных в Турции, показан больший эффект 14-дневной тетрациклин-содержащей последовательной схемы по сравнению с 14-ти дневной тройной терапией (соответственно, 77,2 и 63,6%) [66, 85, 91].

Анализ объединенных данных 9 исследований показал высокую эффективность последовательной терапии с заменой кларитромицина на левофлоксацин. Уровень эрадикации варьировался в пределах 65,4–96,8%. [97]. В исследовании, проведенном в южных регионах Италии, где устойчивость к кларитромицину превышала 15%, а резистентность к левофлоксацину была низкой (< 6%), показано, что эффективность левофлоксацин-содержащей последовательной терапии значительно превышала таковую у последовательного метода эрадикации с включением кларитромицина. Уровень эрадикации превышал 90% [77]. Аналогичные результаты были получены и в других исследованиях, проведенных в Италии [21], Испании [63] и Турции [69]. Увеличение продолжительности левофлоксацин-содержащей последовательной терапии с 10 до 14 дней не повышало ее эффективность, но она была гораздо более результа-

тивной, чем 14-дневная стандартная тройная терапия (соответственно, 86,6 и 45,3%) [71].

В Индии проведено сравнительное изучение эффективности схемы последовательной терапии, исключаяющей тинидазол, в которой применяли амоксициллин, кларитромицин и ИПП во второй 5-дневной фазе. Ее эффективность не отличалась от эффективности 10-дневной стандартной тройной терапии и составила 73,0 и 72,2% соответственно [88].

В исследовании, проведенном в Иране, отмечена эффективность 10-дневной модифицированной последовательной квадротерапии, включавшей ИПП, амоксициллин, висмута трикалия дицитрат, метронидазол или кларитромицин в первой 5-дневной фазе и назначение ИПП, амоксициллина, висмута и фуразолидона в последующие 5 дней. Эффективность эрадикации составила 78,5% при применении схемы, включающей метронидазол, и 82% при замене метронидазола на клиндамицин. Обе схемы не имели никаких преимуществ перед с стандартной тройной 10-дневной терапией (81,1%) [74].

### Сопутствующая терапия

Схемы сопутствующей терапии разработаны в 1998 г. для повышения эффективности эрадикационной терапии на фоне роста резистентности к кларитромицину [67, 83]. Они представляют собой стандартную тройную терапию, модифицированную в квадротерапию дополнением схемы метронидазолом или тинидазолом (по 500 мг 2 раза в день). Стандартная схема включает ИПП, кларитромицин, амоксициллин и метронидазол, применяемые на всем протяжении лечения. Несмотря на краткий курс применения (5–7 дней), данная терапия обеспечивает высокий уровень эрадикации (90%). После пребывания в некотором «забвении» она была «реставрирована» в 2010 г. как альтернатива стандартной тройной и последовательной схемам [17]. Затем было проведено более десятка исследований по оценке ее эффективности в Латинской Америке [37], Азии [43, 48, 49, 51, 85, 93, 96] и Европе [3, 18, 29, 30, 57, 62, 64]. В зависимости от длительности проводимого лечения эффективность сопутствующих схем варьировала в пределах 85–94%. Тем не менее отмечалась и более низкая эффективность сопутствующей терапии после проведения 5-дневных курсов эрадикации в Латинской Америке (73,5%) [37] и Южной Корее (80,7%) [45], а также в двух исследованиях в Турции и Южной Корее, где эрадикацию проводили в течение двух недель (75 и 80,8% соответственно) [45, 82]. По мнению Graham D.Y. и соавт. (2014), на эффективность 14-дневной сопутствующей терапии не повлияет наличие

кларитромицин- и метронидазол-резистентных штаммов *H. pylori*, однако исследователи высказали предположение, что она будет снижаться, если среди циркулирующих штаммов число проявляющих двойную устойчивость в отношении кларитромицина и метронидазола превысит 15%. Поэтому они не рекомендовали применять данную схему эрадикации в регионах, где устойчивость к метронидазолу превышает 60% (Китай, Индия, Иран, Центральная и Южная Америка), а также у лиц, инфицированных штаммами, проявляющими двойную резистентность к кларитромицину и метронидазолу [35]. Подобные штаммы были выявлены в Латинской Америке [37], Южной Корее [45, 48] и Турции [82]. Однако применение 14-дневной сопутствующей терапии будет оправданно в Южной Европе и некоторых азиатских странах, где устойчивость к кларитромицину варьирует в пределах 9–40%, но резистентность к метронидазолу остается на среднем уровне (менее 30–40%). Схемы сопутствующей терапии особенно актуальны для стран, где запрещено применение препаратов висмута. Эффективность применения 10-дневной схемы аналогична эффективности 10-дневной последовательной терапии (93,1 и 93,0% соответственно) [90], однако ее применение более удобно, чем проведение последовательной терапии, требующей замены препаратов во второй фазе лечения. Другим ее достоинством является включение метронидазола в стандартную схему, что делает возможным ее применение в регионах, где последовательная терапия не была эффективной.

При сравнении эффективности применения сопутствующей квадротерапии и стандартной тройной терапии на первом этапе лечения было установлено, что курс 5-дневной терапии обуславливал эрадикацию *H. pylori* у 90% пациентов, а эффективность обеих схем составила, соответственно, 91,4 и 86,1%, но эта разница не была статистически достоверной [45]. Georgopoulos S. и соавт. изучили эффективность 10-дневной квадротерапии в Греции, где уровни резистентности к кларитромицину и метронидазолу составляют в среднем 25 и 40%. Показано, что она составила 90,2%, тогда как результаты проведения стандартной тройной терапии соответствовали 73,8% [28, 29].

Эффективность последовательной терапии у пациентов, инфицированных полирезистентными штаммами *H. pylori* (проявляющими устойчивость к не менее чем двум антибактериальным препаратам), составила 33,3%, при отсутствии полирезистентности — 95,1%. В аналогичных условиях результативность сопутствующей терапии составила 75 и 92,4% соответственно [45]. Однако эти исследования проводили в регионах с низкой резистентностью

к кларитромицину, где стандартная тройная терапия продолжает оставаться эффективной. В Испании, где устойчивость к кларитромицину весьма высока, проведение 10-дневной сопутствующей терапии обуславливало 100% эрадикацию кларитромицин-резистентных и 75% полирезистентных штаммов *H. pylori*. При этом эффективность последовательной терапии в отношении аналогичных изолятов составила 75 и 60% соответственно [62]. В Италии изучена сравнительная эффективность пятидневной сопутствующей квадротерапии с левофлоксацином и 10-дневной последовательной терапии с левофлоксацином у пациентов, ранее не подвергавшихся эрадикации *H. pylori*. Установлено, что применение обеих схем привело к одинаковым результатам (92,2 и 93,3% соответственно), но проведение 5-дневной квадротерапии сопряжено с меньшими финансовыми затратами [21].

Схема сопутствующей квадротерапии с висмутом (омепразол, висмута субцитрат, метронидазол и тетрациклин) включена в «Рекомендации II Азиатско-Тихоокеанского консенсуса» [24] и доклад IV Маастрихтского консенсуса [53] в качестве альтернативы стандартной тройной схеме в регионах с низким уровнем резистентности к кларитромицину, а также в качестве терапии первой линии с высокой устойчивостью к антибиотикам. Эта схема особенно эффективна в регионах, где устойчивость к ее компонентам находится на низком уровне, исключая метронидазол, но резистентность к нему может быть преодолена увеличением дозировок и длительности лечения [23]. В исследовании, проведенном в Турции, а также международном многоцентровом исследовании показано, что увеличение продолжительности лечения до 10 дней обуславливает эффективность более 90% [68, 85].

Недавно разработана схема квадротерапии с висмутом «3 в 1» с использованием капсул, содержащих висмута субцитрат, метронидазол и тетрациклин, что существенно облегчает прием лекарств пациентами. Доказанная эффективность подобной комбинации варьирует в пределах 80–94% [52].

В то же время метаанализ сравнения эффективности 10-дневной висмут-содержащей квадротерапии и стандартной терапии в качестве первой линии эрадикации, проведенный в 2010 г., выявил их достаточно низкую результативность (78,3 и 77% соответственно) [51]. Позже результаты международного многоцентрового исследования по сравнению эффективности аналогичной схемы и 7-дневной стандартной тройной терапии показали, что она обеспечивает 94% эрадикацию, тогда как тройная терапия — лишь 70% [52]. Поэтому оп-

тимальные режимы висмут-содержащей квадротерапии остаются до конца не выясненными, и в клинической практике наиболее часто применяют 10–14-дневные курсы [12].

## Гибридная терапия

В 2011 г. появилось сообщение о применении нового метода эрадикации *H. pylori*, получившего название гибридной терапии. Он представляет собой комбинацию последовательной и сопутствующей схем. Лечение начинают с применения комбинации ИПП и амоксициллина в течение 7 дней с последующей заменой на сопутствующую квадротерапию (ИПП, амоксициллин, кларитромицин и метронидазол) аналогичной продолжительности. Новая схема увеличивала длительность приема амоксициллина до 14 дней, а также дополнительно включала прием трех антибактериальных препаратов во второй фазе лечения в течение 7 дней.

Исследования, проведенные с участием 117 пациентов, показали высокую эффективность данного метода, близкую к 100%. Важным достоинством этой комбинации является возможность достижения эрадикации штаммов *H. pylori*, резистентных к кларитромицину и метронидазолу, а продление курса приема амоксициллина эффективно элиминирует бактерии, проявляющие полирезистентность к обоим препаратам [37]. Позднее Molina-Infante J. и соавт. (2013) провели рандомизированное исследование по сравнению эффективности гибридной и сопутствующей схем у 343 пациентов. Исследуемые группы были сформированы в Италии и Испании из жителей регионов с высоким уровнем устойчивости к кларитромицину и метронидазолу, ранее не получавших эрадикационной терапии. Пациенты первой группы получали омепразол и амоксициллин (курсом в 14 дней) с включением кларитромицина и метронидазола в течение последних 7 дней лечения. Во второй группе проводили одновременный прием все четырех препаратов в течение двух недель. Эффективность обеих схем составила 92 и 96,1%, что указывает на перспективность применения гибридной квадротерапии без висмута и сопутствующей терапии в регионах с высокими уровнями устойчивости к кларитромицину и метронидазолу [64].

## Заключение

В идеале лечение бактериальных инфекций должно базироваться на первоначальном определении чувствительности культуры возбудителя к антибактериальным препаратам *in vitro*. Нередко подобный подход оказывается невоз-

можен в отношении *H. pylori*, поскольку выделение бактерий требует проведения фиброгастро-дуоденоскопии, а эта инвазивная процедура не показана пациентам с диспепсиями моложе 45 лет при отсутствии соответствующих симптомов. В других случаях, например при неудачах терапии первой линии, все же следует проводить эндоскопический забор биоптатов слизистой желудка с последующим микробиологическим определением чувствительности выделенных изолятов. При невозможности выделения культур *H. pylori* выбор эффективной схемы эрадикации можно проводить эмпирически, ориентируясь на региональные особенности устойчивости штаммов *H. pylori*. К сожалению, в РФ подобные исследования носят эпизодический характер и не дают цельной картины по регионам. Однако при неудачах эрадикации с применением схем второй линии от эмпирического назначения последующего лечения следует отказаться до получения результатов определения чувствительности *in vitro*.

Относительно проблемы устойчивости к кларитромицину и последующего эмпирического выбора схемы эрадикации надо помнить, что если в регионе устойчивость к нему находится в пределах 7–10%, то тройная терапия с включением кларитромицина будет менее эффективной. Если рост резистентности к кларитромицину достигает 15–20%, то схемы последовательной и сопутствующей эрадикации, включающие кларитромицин, также будут малоэффективными. Аналогичная ситуация весьма вероятна и при 40% устойчивости к метронидазолу, поскольку рост резистентности к обоим препаратам обычно взаимосвязан.

Альтернативой сопутствующей терапии является гибридная схема, эффективная у 90% пациентов, инфицированных штаммами *H. pylori*, проявляющими высокую резистентность к кларитромицину и метронидазолу. Перспективным представляется проведение квадротерапии, включающей висмут, с пролонгированием курса до 14 дней для преодоления устойчивости к метронидазолу.

Также следует иметь в виду, что пациент должен принимать много препаратов и его готовность следовать предписаниям врача играет важную роль в проведении лечения. В этом плане интерес представляет 5-дневная схема сопутствующей терапии с включением левофлоксацина [22], но ее следует с осторожностью использовать в качестве терапии первой линии в регионах с высокой частотой обнаружения штаммов *H. pylori*, резистентных к фторхинолонам. Кроме того, эта схема может быть неплохой альтернативой в качестве «терапии спасения», проводимой пациентам, инфицированным чувствительными к фторхинолонам штаммами [98].

## Список литературы/References

1. Кудрявцева Л.В., Исаков В.А., Иваников И.О. Резистентность *H. pylori* к метронидазолу, кларитромицину и амоксициллину в Москве, Санкт-Петербурге и Абакане в 2001 г. // Педиатрия. 2002. № 2. С. 61–63. [Kudryavtseva L.V., Isakov V.A., Ivanikov I.O. *H. pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin and amoxicillin in Moscow, St. Petersburg and Abakan in 2001. *Pediatriya = Pediatrics*, 2002, no. 2, pp. 61–63. (In Russ.)]
2. Кудрявцева Л.В., Исаков В.А., Щербаков П.Л., Иваников И.О., Минаев В.И. Динамика резистентности штаммов *Helicobacter pylori* к антибиотикам у городского населения в России в 1996–1998 гг. // *Helicobacter pylori*: революция в гастроэнтерологии / Под ред. В.Т. Ивашкина, Ф. Мегро, Т.Л. Лапиной. Москва: Триада-Х, 1999. С. 191–196. [Kudryavtseva L.V., Isakov V.A., Ivanikov I.O., Shcherbakov P.L., Ivanikov I.O., Minaev V.I. Dynamics of resistance of *Helicobacter pylori* strains to antibiotics in the urban population in Russia in 1996–1998. In: *Helicobacter pylori*: a revolution in gastroenterology. Ed. by Ivashkin V.T., Megro F., Lapina T.L. Moscow: Triad-X, 1999, pp. 191–196. (In Russ.)]
3. Старостин Б.Д. Опыт использования двухэтапной антихеликобактерной терапии // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2008. № 5 (S32). С. 38. [Starostin B.D. Experience of using two-stage antihelicobacter therapy // *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2008, no. 5 (S32), p. 38. (In Russ.)]
4. Ткаченко Е.И., Авалуева Е.Б., Успенский Ю.П., Волков М.Ю., Сказываева Е.В., Барышникова Н.В., Можелис Ю.В., Захарченко М.М. Эрадикационная терапия, включающая пробиотики: консенсус эффективности и безопасности // Клиническое питание. 2005. № 1. С. 14–20. [Tkachenko E.I., Avalueva E.B., Uspenskiy Yu.P., Volkov M. Yu., Skazyvaeva E.V., Baryshnikova N.V., Mogelis Yu.V., Zakharchenko M.M. Eradication therapy including probiotics: consensus of efficacy and safety. *Klinicheskoe pitaniye = Clinical Nutrition*, 2005, no. 1, pp. 14–20. (In Russ.)]
5. Хавкин А.И., Блат С.Ф. Роль пробиотической терапии при инфекции *Helicobacter pylori* у детей // Детские инфекции. 2007. № 4. С. 53–58. [Khavkin A.I., Blat S.F. The role of probiotic therapy in *Helicobacter pylori* infection in children. *Detskiiye Infektsii = Children Infections*, 2007, no. 4, pp. 53–58. (In Russ.)]
6. Ahmad K., Fatemeh F., Mehri N., Maryam S. Probiotics for the treatment of pediatric helicobacter pylori infection: a randomized double blind clinical trial. *Iran. J. Pediatr.*, 2013, vol. 23, no. 1, pp. 79–84.
7. Baik S.J., Yi S.Y., Park H.S., Park B.H. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in female Vietnamese immigrants to Korea. *World J. Gastroenterol.*, 2012, vol. 18, no. 6, pp. 517–521. doi: 10.3748/wjg.v18.i6.517
8. Berning M., Krasz S., Miehke S. Should quinolones come first in *Helicobacter pylori* therapy? *Therap. Adv. Gastroenterol.*, 2011, vol. 4, no. 2, pp. 103–114. doi: 10.1177/1756283X10384171
9. Buckley M.J., Xia H.X., Hyde D.M., Keane C.T., O'Morain C.A. Metronidazole resistance reduces efficacy of triple therapy and leads to secondary clarithromycin resistance. *Dig. Dis. Sci.*, 1997, vol. 42, no. 10, pp. 2111–2115. doi: 10.1023/a:1018882804607
10. Calvet X., García N., López T., Gisbert J.P., Gene E., Roque M. A meta-analysis of short versus long therapy with a proton pump inhibitor, clarithromycin and either metronidazole or amoxicillin for treating *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2000, vol. 14, no. 5, pp. 603–609. doi: 10.1046/j.1365-2036.2000.00744.x
11. Cetinkaya Z.A., Sezikli M., Güzelbulut F., Coşgun S., Düzgün S., Kurdaş O.Ö. Comparison of the efficacy of the two tetracycline-containing sequential therapy regimens for the eradication of *Helicobacter pylori*: 5 days versus 14 days amoxicillin. *Helicobacter*, 2010, vol. 15, no. 2, pp. 143–147.
12. Chey W.D., Wong B.C. American College of Gastroenterology Guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Gastroenterol.*, 2007, vol. 102, no. 8, pp. 1808–1825. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01393.x
13. Choi H.S., Chun H.J., Park S.H., Keum B., Seo Y.S., Kim Y.S., Jeon Y.T., Um S.H., Lee H.S., Kim C.D., Ryu H.S. Comparison of sequential and 7-, 10-, 14-days triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol.*, 2012, vol. 18, no. 19, pp. 2377–2382. doi: 10.3748/wjg.v18.i19.2377
14. Choi W.H., Park D.I., Oh S.J., Baek Y.H., Hong C.H., Hong E.J., Song M.J., Park S.K., Park J.H., Kim H.D., Cho Y.K., Sohn C.I., Jeon W.K., Kim B.I. Effectiveness of 10 day-sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication in Korea. *Korean J. Gastroenterol.*, 2008, vol. 51, no. 5, pp. 280–284.
15. Chuah S.K., Tsay F.W., Hsu P.L., Wu D.C. A new look at anti-*Helicobacter pylori* therapy. *World J. Gastroenterol.*, 2011, vol. 17, no. 35, pp. 3971–3975. doi: 10.3748/wjg.v17.i35.3971
16. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. European *Helicobacter Pylori* Study Group. *Gut*, 1997, vol. 41, no. 1, pp. 8–13.
17. De Francesco V., Giorgio F., Hassan C., Manes G., Vannella L., Panella C., Ierardi E., Zullo A. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. *J. Gastrointest. Liver Dis.*, 2010, vol. 19, no. 4, pp. 409–414.
18. De Francesco V., Hassan C., Ridola L., Giorgio F., Ierardi E., Zullo A. Sequential, concomitant and hybrid first-line therapies for *Helicobacter pylori* eradication: a prospective randomized study. *J. Med. Microbiol.*, 2014, vol. 63, pt. 5, pp. 748–752. doi: 10.1099/jmm.0.072322-0
19. De Francesco V., Zullo A., Hassan C., Faleo D., Enzo I., Panella C., Morini S. Two new treatment regimens for *Helicobacter pylori* eradication: a randomised study. *Dig. Liver Dis.*, 2001, vol. 33, no. 8, pp. 676–679. doi: 10.1177/1756283X09343326
20. Du Y.Q., Su T., Fan J.G., Lu Y.X., Zheng P., Li X.H., Guo C.Y., Xu P., Gong Y.F., Li Z.S. Ajuvant probiotics improve the eradication effect of triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol.*, 2012, vol. 18, no. 3, pp. 6302–6307. doi: 10.3748/wjg.v18.i3.6302
21. Federico A., Nardone G., Gravina A.G., Iovene M.R., Miranda A., Compare D., Piloni P.A., Rocco A., Ricciardiello L., Marmo R., Loguercio C., Romano M. Efficacy of 5-day levofloxacin-containing concomitant therapy in eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 2012, vol. 143, no. 1, pp. 55–61. doi: 10.1053/j.gastro.2012.03.043
22. Filipec Kanizaj T., Katicic M., Skurla B., Ticak M., Plecko V., Kalenic S. *Helicobacter pylori* eradication therapy success regarding different treatment period based on clarithromycin or metronidazole triple-therapy regimens. *Helicobacter*, 2009, vol. 14, no. 1, pp. 29–35. doi: 10.1111/j.1523-5378.2009.00656.x

23. Fischbach L., Evans E.L. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2007, vol. 26, no. 3, pp. 343–357. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03386.x
24. Fock K.M., Katelaris P., Sugano K., Ang T.L., Hunt R., Talley N.J., Lam S.K., Xiao S.D., Tan H.J., Wu C.Y., Jung H.C., Hoang B.H., Kachintorn U., Goh K.L., Chiba T., Rani A.A.; Second Asia-Pacific Conference. Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2009, vol. 24, no. 10, pp. 1587–1600. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.05982.x
25. Ford A., Moayyedi P. How can the current strategies for *Helicobacter pylori* eradication therapy be improved? *Can. J. Gastroenterol.*, 2003, vol. 17, suppl. B, pp. 36B–40B. doi: 10.1155/2003/714124
26. Fuccio L., Minardi M.E., Zagari R.M., Grilli D., Magrini N., Dazzoli F. Meta-analysis: duration of first-line proton-pump inhibitor based triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Ann. Intern. Med.*, 2007, vol. 147, no. 8, pp. 553–562.
27. Gatta L., Vakil N., Leandro G., Di Mario F., Vaira D. Sequential therapy or triple therapy for *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials in adults and children. *Am. J. Gastroenterol.*, 2009, vol. 104, no. 12, pp. 3069–3079. doi: 10.1038/ajg.2009.555
28. Georgopoulos S., Papastergiou V., Xirouchakis E., Laudi F., Lisgos P., Spiliadi C., Papantoniou N., Karatapanis S. Nonbismuth quadruple “concomitant” therapy versus standard triple therapy, both of the duration of 10 days, for first-line *H. pylori* eradication: a randomized trial. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2013, vol. 47, no. 3, pp. 228–232. doi: 10.1097/MCG.0b013e31826015b0
29. Georgopoulos S., Papastergiou V., Xirouchakis E., Laudi F., Papantoniou N., Lisgos P., Spiliadi C., Fragou P., Skorda L., Karatapanis S. Evaluation of a four-drug, three-antibiotic, nonbismuth-containing “concomitant” therapy as first-line *Helicobacter pylori* eradication regimen in Greece. *Helicobacter*, 2012, vol. 17, no. 1, pp. 49–53. doi: 10.1111/j.1523-5378.2011.00911.x
30. Georgopoulos S.D., Xirouchakis E., Martinez-Gonzalez B., Sgouras D.N., Spiliadi C., Mentis A.F., Laoudi F. Clinical evaluation of a ten-day regimen with esomeprazole, metronidazole, amoxicillin, and clarithromycin for the eradication of *Helicobacter pylori* in a high clarithromycin resistance area. *Helicobacter*, 2013, vol. 18, no. 6, pp. 459–467. doi: 10.1111/hel.12062
31. Gisbert J.P., Bermejo F., Castro-Fernández M., Pérez-Aisa A., Fernández-Bermejo M., Tomas A., Barrio J., Bory F., Almela P., Sánchez-Pobre P., Cosme A., Ortiz V., Niño P., Khorrami S., Benito L.M., Carneros J.A., Lamas E., Modolell I., Franco A., Ortuño J., Rodrigo L., García-Durán F., O’Callaghan E., Ponce J., Valer M.P., Calvet X.; *H. pylori* Study Group of the Asociación Española de Gastroenterología. Second-line rescue therapy with levofloxacin after *H. pylori* treatment failure: a Spanish multicenter study of 300 patients. *Am. J. Gastroenterol.*, 2008, vol. 103, no. 1, pp. 71–76. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01500.x
32. Gisbert J.P., Calvet X., O’Connor A., Mégraud F., O’Morain C.A. Sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a critical review. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2010, vol. 44, no. 5, pp. 313–325. doi: 10.1097/MCG.0b013e3181c8a1a3
33. Goldman C.G., Barrado D.A., Balcarce N., Rua E.C., Oshiro M., Calcagno M.L., Janjetic M., Fuda J., Weill R., Salgueiro M.J., Valencia M.E., Zubillaga M.B., Boccio J.R. Effect of a probiotic food as an adjuvant to triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection in children. *Nutrition*, 2006, vol. 22, no. 10, pp. 984–988. doi: 10.1016/j.nut.2006.06.008
34. Graham D.Y., Fischbach L. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut*, 2010, vol. 59, no. 8, pp. 1143–1153. doi: 10.1136/gut.2009.192757
35. Graham D.Y., Lee Y.C., Wu M.S. Rational *Helicobacter pylori* therapy: evidence-based medicine rather than medicine-based evidence. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, vol. 12, no. 2, pp. 177–186. doi: 10.1016/j.cgh.2013.05.028
36. Graham D.Y., Shiotani A. New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, 2008, vol. 5, no. 6, pp. 321–331. doi: 10.1038/ncpgasthep1138
37. Greenberg E.R., Anderson G.L., Morgan D.R., Torres J., Chey W.D., Bravo L.E., Dominguez R.L., Ferreccio C., Herrero R., Lazzano-Ponce E.C., Meza-Montenegro M.M., Peña R., Peña E.M., Salazar-Martínez E., Correa P., Martínez M.E., Valdivieso M., Goodman G.E., Crowley J.J., Baker L.H. 14-day triple, 5-day concomitant, and 10-day sequential therapies for *Helicobacter pylori* infection in seven Latin American sites: a randomised trial. *Lancet*, 2011, vol. 378, no. 9790, pp. 507–514. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60825-8
38. Horiki N., Omata F., Uemura M., Suzuki S., Ishii N., Iizuka Y., Fukuda K., Fujita Y., Katsurahara M., Ito T., Cesar G.E., Imoto I., Takei Y. Annual change of primary resistance to clarithromycin among *Helicobacter pylori* isolates from 1996 through 2008 in Japan. *Helicobacter*, 2009, vol. 14, no. 5, pp. 86–90. doi: 10.1111/j.1523-5378.2009.00714.x
39. Horvath A., Dziechciarz P., Szajewska H. Meta-analysis: sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication in children. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2012, vol. 36, no. 6, pp. 534–541. doi: 10.1111/j.1365-2036.2012.05229.x
40. Huang Y.K., Wu M.C., Wang S.S., Kuo C.H., Lee Y.C., Chang L.L., Wang T.H., Chen Y.H., Wang W.M., Wu D.C., Kuo F.C. Lansoprazole-based sequential and concomitant therapy for the first-line *Helicobacter pylori* eradication. *J. Dig. Dis.*, 2012, vol. 13, no. 4, pp. 232–238. doi: 10.1111/j.1751-2980.2012.00575.x
41. Hurduc V., Plesca D., Dragomir D., Sajin M., Vandenplas Y. A randomized, open trial evaluating the effect of *Saccharomyces boulardii* on the eradication rate of *Helicobacter pylori* infection in children. *Acta Paediatr.*, 2009, vol. 98, no. 1, pp. 127–131. doi: 10.1111/j.1651-2227.2008.00977.x
42. Jafri N.S., Hornung C.A., Howden C.W. Meta-analysis: sequential therapy appears superior to standard therapy for *Helicobacter pylori* infection in patients naive to treatment. *Ann. Intern. Med.*, 2008, vol. 148, no. 13, pp. 923–931. doi: 10.7326/0003-4819-148-12-200806170-00226
43. Karatapanis S., Georgopoulos S.D., Papastergiou V., Skorda L., Papantoniou N., Lisgos P., Kouvidou C., Fragkou P., Mentis A. 7, 10 and 14-days rabeprazole-based standard triple therapies for *H. pylori* eradication: are they still effective? A randomized trial. *Acta Gastroenterol. Belg.*, 2011, vol. 74, no. 3, pp. 407–412.
44. Kate V., Kalayarsan R., Ananthakrishnan N. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a systematic review of recent evidence. *Drugs*, 2013, vol. 73, no. 8, pp. 815–824. doi: 10.1007/s40265-013-0053-z
45. Kim S.Y., Lee S.W., Hyun J.J., Jung S.W., Koo J.S., Yim H.J., Park J.J., Chun H.J., Choi J.H. Comparative study of *Helicobacter pylori* eradication rates with 5-day quadruple “concomitant” therapy and 7-day standard triple therapy. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2013, vol. 47, no. 1, pp. 21–24. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182548ad4

46. Kongchayanun C., Vilaichone R.K., Pornthisarn B., Amornsawadwattana S., Mahachai V. Pilot studies to identify the optimum duration of concomitant Helicobacter pylori eradication therapy in Thailand. *Helicobacter*, 2012, vol. 17, no. 4, pp. 282–285. doi: 10.1111/j.1523-5378.2012.00953.x
47. Lee S.K., Lee S.W., Park J.Y., Kwon B.S., Kim S.Y., Hyun J.J., Kim J.H., Jung S.W., Koo J.S., Yim H.J., Choi J.H. Effectiveness and safety of repeated quadruple therapy in Helicobacter pylori infection after failure of second-line quadruple therapy: repeated quadruple therapy as a third-line therapy. *Helicobacter*, 2011, vol. 16, no. 5, pp. 410–414. doi: 10.1111/j.1523-5378.2011.00870.x
48. Lim J.H., Lee D.H., Choi C., Lee S.T., Kim N., Jeong S.H., Kim J.W., Hwang J.H., Park Y.S., Lee S.H. Clinical outcomes of two-week sequential and concomitant therapies for Helicobacter pylori eradication: a randomized pilot study. *Helicobacter*, 2013, vol. 18, no. 6, pp. 180–186. doi: 10.1111/hel.12034
49. Lionetti E., Miniello V.L., Castellaneta S.P., Magistà A.M., de Canio A., Maurogiovanni G., Ierardi E., Cavallo L., Francavilla R. Lactobacillus reuteri therapy to reduce side-effects during anti-Helicobacter pylori treatment in children: a randomized placebo controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2006, vol. 24, no. 10, pp. 1461–1468. doi: 10.1111/j.1365-2036.2006.03145.x
50. Liou J.M., Chen C.C., Chen M.J., Chen C.C., Chang C.Y., Fang Y.J., Lee J.Y., Hsu S.J., Luo J.C., Chang W.H., Hsu Y.C., Tseng C.H., Tseng P.H., Wang H.P., Yang U.C., Shun C.T., Lin J.T., Lee Y.C., Wu M.S.; Taiwan Helicobacter Consortium. Sequential versus triple therapy for the first-line treatment of Helicobacter pylori: a multicentre, open-label, randomised trial. *Lancet*, 2013, vol. 381, no. 9862, pp. 205–213. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61579-7
51. Luther J., Higgins P.D., Schoenfeld P.S., Moayyedi P., Vakil N., Chey W.D. Empiric quadruple vs. triple therapy for primary treatment of Helicobacter pylori infection: systematic review and meta-analysis of efficacy and tolerability. *Am. J. Gastroenterol.*, 2010, vol. 105, no. 1, pp. 65–73. doi: 10.1038/ajg.2009.508
52. Malfertheiner P., Bazzoli F., Delchier J.C., Celiński K., Giguère M., Rivière M., Mégraud F.; Pylora Study Group. Helicobacter pylori eradication with a capsule containing bismuth subcitrate potassium, metronidazole, and tetracycline given with omeprazole versus clarithromycin-based triple therapy: a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet*, 2011, vol. 377, no. 9769, pp. 905–913. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60020-2
53. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C.A., Atherton J., Axon A.T., Bazzoli F., Gensini G.F., Gisbert J.P., Graham D.Y., Rokkas T., El-Omar E.M., Kuipers E.J.; European Helicobacter Study Group. Management of Helicobacter pylori infection – the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*, 2012, vol. 61, no. 5, pp. 646–664. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302084
54. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C., Bazzoli F., El-Omar E., Graham D., Hunt R., Rokkas T., Vakil N., Kuipers E.J. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*, 2007, vol. 56, no. 6, pp. 772–781. doi: 10.1136/gut.2006.101634
55. Malfertheiner P., Mégraud F., O'Morain C., Hungin A.P., Jones R., Axon A., Graham D.Y., Tytgat G.; European Helicobacter Pylori Study Group (EHPSG). Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection – the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2002, vol. 16, no. 2, pp. 167–180. doi: 10.1046/j.1365-2036.2002.01169.x
56. McGuigan J.E. Helicobacter pylori: the versatile pathogen. *Dig. Dis.*, 1996, vol. 14, no. 5, pp. 289–303. doi: 10.1159/000171560
57. McNicholl A.G., Marin A.C., Molina-Infante J., Castro M., Barrio J., Ducons J., Calvet X., de la Coba C., Montoro M., Bory F., Perez-Aisa A., Forné M., Gisbert J.P.; Participant Centres. Randomised clinical trial comparing sequential and concomitant therapies for Helicobacter pylori eradication in routine clinical practice. *Gut*, 2014, vol. 63, no. 2, pp. 244–249. doi: 10.1136/gutjnl-2013-304820
58. Mégraud F. H. pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*, 2004, vol. 53, no. 9, pp. 1374–1384. doi: 10.1136/gut.2003.022111
59. Mégraud F. Helicobacter pylori and antibiotic resistance. *Gut*, 2007, vol. 56, no. 11: 1502. doi: 10.1136/gut.2007.132514
60. Mégraud F., Coenen S., Versporten A., Kist M., Lopez-Brea M., Hirschl A.M., Andersen L.P., Goossens H., Glupczynski Y. Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*, 2013, vol. 62, no. 1, pp. 34–42. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302254
61. Mirzaee V., Rezaehosseini O. Randomized control trial: comparison of triple therapy plus probiotic yogurt vs. standard triple therapy on Helicobacter pylori eradication. *Iran Red. Crescent Med. J.*, 2012, vol. 14, no. 10, pp. 657–666.
62. Molina-Infante J., Pazos-Pacheco C., Vinagre-Rodriguez G., Perez-Gallardo B., Dueñas-Sadornil C., Hernandez-Alonso M., Gonzalez-Garcia G., Mateos-Rodriguez J.M., Fernandez-Bermejo M., Gisbert J.P. Nonbismuth quadruple (concomitant) therapy: empirical and tailored efficacy versus standard triple therapy for clarithromycin-susceptible Helicobacter pylori and versus sequential therapy for clarithromycin-resistant strains. *Helicobacter*, 2012, vol. 17, no. 4, pp. 269–276. doi: 10.1111/j.1523-5378.2012.00947.x
63. Molina-Infante J., Perez-Gallardo B., Fernandez-Bermejo M., Hernandez-Alonso M., Vinagre G., Dueñas C., Mateos-Rodriguez J.M., Gonzalez-Garcia G., Abadia E.G., Gisbert J.P. Clinical trial: clarithromycin vs. levofloxacin in first-line triple and sequential regimens for Helicobacter pylori eradication. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2010, vol. 31, no. 10, pp. 1077–1084. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04274.x
64. Molina-Infante J., Romano M., Fernandez-Bermejo M., Federico A., Gravina A.G., Pozzati L., Garcia-Abadia E., Vinagre-Rodriguez G., Martinez-Alcala C., Hernandez-Alonso M., Miranda A., Iovene M.R., Pazos-Pacheco C., Gisbert J.P. Optimized nonbismuth quadruple therapies cure most patients with Helicobacter pylori infection in populations with high rates of antibiotic resistance. *Gastroenterology*, 2013, vol. 145, no. 1, pp. 121–128. doi: 10.1053/j.gastro.2013.03.050
65. Müller P., Simon B. Helicobacter pylori eradication: modified triple therapy with lansoprazole. *Fortschr. Med.*, 1996, vol. 114, no. 35/36, pp. 497–499.
66. Nadir I., Yonem O., Ozin Y., Kilic Z.M., Sezgin O. Comparison of two different treatment protocols in Helicobacter pylori eradication. *South. Med. J.*, 2011, vol. 104, no. 2, pp. 102–105. doi: 10.1097/SMJ.0b013e318200c209
67. Okada M., Oki K., Shirotani T., Seo M., Okabe N., Maeda K., Nishimura H., Ohkuma K., Oda K. A new quadruple therapy for the eradication of Helicobacter pylori. Effect of pretreatment with omeprazole on the cure rate. *J. Gastroenterol.*, 1998, vol. 33, no. 5, pp. 640–645. doi: 10.1007/s005350050150

68. O'Morain C., Borody T., Farley A., De Boer W.A., Dallaire C., Schuman R., Piotrowski J., Fallone C.A., Tytgat G., Mégraud F., Spénard J.; International multicentre study. Efficacy and safety of single-triple capsules of bismuth biscalcitrate, metronidazole and tetracycline, given with omeprazole, for the eradication of *Helicobacter pylori*: an international multicentre study. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2003, vol. 17, no. 3, pp. 415–420. doi: 10.1046/j.1365-2036.2003.01434.x
69. Ozdil K., Calhan T., Sahin A., Senates E., Kahraman R., Yüzbasioğlu B., Demirdag H., Sökmen M.H. Levofloxacin based sequential and triple therapy compared with standard plus probiotic combination for *Helicobacter pylori* eradication. *Hepatogastroenterology*, 2011, vol. 58, no. 109, pp. 1148–1152. doi: 10.5754/hge11075
70. Park H.G., Jung M.K., Jung J.T., Kwon J.G., Kim E.Y., Seo H.E., Lee J.H., Yang C.H., Kim E.S., Cho K.B., Park K.S., Lee S.H., Kim K.O., Jeon S.W. Randomised clinical trial: a comparative study of 10-day sequential therapy with 7-day standard triple therapy for *Helicobacter pylori* infection in naive patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2012, vol. 35, no. 1, pp. 56–65. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04902.x
71. Polat Z., Kadayifci A., Kantarcioglu M., Ozcan A., Emer O., Uygun A. Comparison of levofloxacin-containing sequential and standard triple therapies for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Intern. Med.*, 2012, vol. 23, no. 2, pp. 165–168. doi: 10.1016/j.ejim.2011.02.011
72. Prasertpetmanee S., Mahachai V., Vilaichone R.K. Improved efficacy of proton pump inhibitor — amoxicillin — clarithromycin triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication in low clarithromycin resistance areas or for tailored therapy. *Helicobacter*, 2013, vol. 18, no. 4, pp. 270–273. doi: 10.1111/hel.12041
73. Rajper S., Khan E., Ahmad Z., Alam S.M., Akbar A., Hasan R. Macrolide and fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori* isolates: an experience at a tertiary care centre in Pakistan. *J. Pak. Med. Assoc.*, 2012, vol. 62, no. 11, pp. 1140–1144.
74. Riahizadeh S., Malekzadeh R., Agah S., Zendehehd N., Sotoudehmanesh R., Ebrahimi-Dariani N., Pourshams A., Vahedi H., Mikaeli J., Khatibian M., Massarrat S. Sequential metronidazole-furazolidone or clarithromycin-furazolidone compared to clarithromycin-based quadruple regimens for the eradication of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease: a double-blind randomized controlled trial. *Helicobacter*, 2010, vol. 15, no. 6, pp. 497–504. doi: 10.1111/j.1523-5378.2010.00798.x
75. Rimbara E., Fischbach L.A., Graham D.Y. Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2011, vol. 8, no. 2, pp. 79–88. doi: 10.1038/nrgastro.2010.210
76. Rinaldi V., Zullo A., Pugliano F., Valente C., Diana F., Attili A.F. The management of failed dual or triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1997, vol. 11, no. 5, pp. 929–933. doi: 10.1046/j.1365-2036.1997.00228.x
77. Romano M., Cuomo A., Gravina A.G., Miranda A., Iovene M.R., Tiso A., Sica M., Rocco A., Salerno R., Marmo R., Federico A., Nardone G. Empirical levofloxacin-containing versus clarithromycin-containing sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a randomised trial. *Gut*, 2010, vol. 59, no. 11, pp. 1465–1470. doi: 10.1136/gut.2010.215350
78. Šykora J., Valecková K., Amlerová J., Siala K., Dedek P., Watkins S., Varvarovská J., Stozický F., Pazdiora P., Schwarz J. Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 and the eradication of *H. pylori* in children: a prospective randomized double-blind study. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2005, vol. 39, no. 8, pp. 692–698. doi: 10.1097/01.mcg.0000173855.77191.44
79. Szajewska H., Albrecht P., Topczewska-Cabane A. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial: effect of lactobacillus GG supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates and side effects during treatment in children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2009, vol. 48, no. 4, pp. 431–436. doi: 10.1097/mpg.0b013e318182e716
80. Tolone S., Pellino V., Vitaliti G., Lanzafame A., Tolone C. Evaluation of *Helicobacter pylori* eradication in pediatric patients by triple therapy plus lactoferrin and probiotics compared to triple therapy alone. *Ital. J. Pediatr.*, 2012, vol. 38, no. 1: 63. doi: 10.1186/1824-7288-38-63
81. Tong J.L., Ran Z.H., Shen J., Xiao S.D. Sequential therapy vs. standard triple therapies for *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 2009, vol. 34, no. 1, pp. 41–53. doi: 10.1111/j.1365-2710.2008.00969.x
82. Toros A.B., Ince A.T., Kesici B., Saglam M., Polat Z., Uygun A. A new modified concomitant therapy for *Helicobacter pylori* eradication in Turkey. *Helicobacter*, 2011, vol. 16, no. 3, pp. 225–228. doi: 10.1111/j.1523-5378.2011.00823.x
83. Treiber G., Ammon S., Schneider E., Klotz U. Amoxicillin/metronidazole/omeprazole/clarithromycin: a new, short quadruple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter*, 1998, vol. 3, no. 1, pp. 54–58. doi: 10.1046/j.1523-5378.1998.08019.x
84. Usta Y., Saltik-Temizel I.N., Demir H., Uslu N., Ozen H., Gurakan F., Yuce A. Comparison of short- and long-term treatment protocols and the results of second-line quadruple therapy in children with *Helicobacter pylori* infection. *J. Gastroenterol.*, 2008, vol. 43, no. 6, pp. 429–433. doi: 10.1007/s00535-008-2187-4
85. Uygun A., Kadayifci A., Yesilova Z., Safali M., Ilgan S., Karaeren N. Comparison of sequential and standard triple-drug regimens for *Helicobacter pylori* eradication: a 14-day, open-label, randomized, prospective, parallel-arm study in adult patients with nonulcer dyspepsia. *Clin. Ther.*, 2008, vol. 30, no. 3, pp. 528–534. doi: 10.1016/j.clinthera.2008.03.009
86. Vaira D., Zullo A., Vakil N., Gatta L., Ricci C., Perna F., Hassan C., Bernabucci V., Tampieri A., Morini S. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.*, 2007, vol. 146, no. 8, pp. 556–563. doi: 10.7326/0003-4819-146-8-200704170-00006
87. Vakil N., Mégraud F. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 2007, vol. 133, no. 3, pp. 985–1001. doi: 10.1053/j.gastro.2007.07.008
88. Valooran G.J., Kate V., Jagdish S., Basu D. Sequential therapy versus standard triple drug therapy for eradication of *Helicobacter pylori* in patients with perforated duodenal ulcer following simple closure. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2011, vol. 46, no. 9, pp. 1045–1050. doi: 10.3109/00365521.2011.584894
89. Wimer S.M., Schoonover L., Garrison M.W. Levofloxacin: a therapeutic review. *Clin. Ther.*, 1998, vol. 20, no. 6, pp. 1049–1070. doi: 10.1016/s0149-2918(98)80104-5
90. Wu D.C., Hsu P.I., Wu J.Y., Opekun A.R., Kuo C.H., Wu I.C., Wang S.S., Chen A., Hung W.C., Graham D.Y. Sequential and concomitant therapy with four drugs is equally effective for eradication of *H. pylori* infection. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2010, vol. 8, no. 1, pp. 36–41. doi: 10.1016/j.cgh.2009.09.030

91. Yakut M., Çinar K., Seven G., Bahar K., Özden A. Sequential therapy for Helicobacter pylori eradication. *Turk. J. Gastroenterol.*, 2010, vol. 21, no. 3, pp. 206–211. doi: 10.4318/tjg.2010.0089
92. Yanai A., Sakamoto K., Akanuma M., Ogura K., Maeda S. Non-bismuth quadruple therapy for first-line Helicobacter pylori eradication: a randomized study in Japan. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.*, 2012, vol. 3, no. 1, pp. 1–6. doi: 10.4292/wjgpt.v3.i1.1
93. Zendedel A., Moradimoghadam F., Almasi V., Zivarifar H. Antibiotic resistance of Helicobacter pylori in Mashhad, Iran. *J. Pak. Med. Assoc.*, 2013, vol. 63, no. 3, pp. 336–339.
94. Zhao H.M., Ou-Yang H.J., Duan B.P., Xu B., Chen Z.Y., Tang J., You J.Y. Clinical effect of triple therapy combined with *Saccharomyces boulardii* in the treatment of Helicobacter pylori infection in children. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.*, 2014, vol. 16, no. 3, pp. 230–233.
95. Zou J., Dong J., Yu X. Meta-analysis: Lactobacillus containing quadruple therapy versus standard triple first-line therapy for Helicobacter pylori eradication. *Helicobacter*, 2009, vol. 14, no. 5, pp. 97–107. doi: 10.1111/j.1523-5378.2009.00716.x
96. Zullo A., De Francesco V., Hassan C., Morini S., Vaira D. The sequential therapy regimen for Helicobacter pylori eradication: a pooled-data analysis. *Gut*, 2007, vol. 56, no. 10, pp. 1353–1357. doi: 10.1136/gut.2007.125658
97. Zullo A., De Francesco V., Hassan C., Ridola L., Repici A., Bruzzese V., Vaira D. Modified sequential therapy regimens for Helicobacter pylori eradication: a systematic review. *Dig. Liver Dis.*, 2013, vol. 45, no. 1, pp. 18–22. doi: 10.1016/j.dld.2012.08.025
98. Zullo A., Hassan C., Ridola L., De Francesco V., Vaira D. Standard triple and sequential therapies for Helicobacter pylori eradication: an update. *Eur. J. Intern. Med.*, 2013, vol. 24, no. 1, pp. 16–19. doi: 10.1016/j.ejim.2012.07.006
99. Zullo A., Rinaldi V., Winn S., Meddi P., Lionetti R., Hassan C., Ripani C., Tomaselli G., Attili A.F. A new highly effective short-term therapy schedule for Helicobacter pylori eradication. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2000, vol. 14, no. 6, pp. 715–718. doi: 10.1046/j.1365-2036.2000.00766.x

**Авторы:**

**Поздеева А.О.**, ассистент кафедры терапии и семейной медицины Казанской государственной медицинской академии — филиала РМАНПО МЗ РФ, г. Казань, Россия;  
**Поздеев О.К.**, д.м.н., профессор кафедры микробиологии Казанской государственной медицинской академии — филиала РМАНПО МЗ РФ, г. Казань, Россия;  
**Гуляев П.Е.**, ассистент кафедры микробиологии имени академика В.М. Аристовского, Казанский государственный медицинский университет МЗ РТ, г. Казань, Россия;  
**Валеева Ю.В.**, к.м.н., доцент кафедры неотложной медицинской помощи и симуляционной медицины Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань, Россия;  
**Савинова А.Н.**, к.б.н., доцент кафедры микробиологии имени академика В.М. Аристовского, Казанский государственный медицинский университет МЗ РТ, г. Казань, Россия.

**Authors:**

**Pozdeeva A.O.**, Assistant Professor, Department of Internal and Family Medicine, Kazan State Medical Academy — Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Kazan, Russian Federation;  
**Pozdeev O.K.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology, Kazan State Medical Academy — Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Kazan, Russian Federation;  
**Gulyaev P.E.**, Assistant Professor, Department of Microbiology named after academician V.M. Aristovsky, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;  
**Valeeva Yu.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Emergency and Simulation Medicine, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russian Federation;  
**Savinova A.N.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology named after academician V.M. Aristovsky, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation.

Поступила в редакцию 09.02.2021  
 Принята к печати 30.05.2021

Received 09.02.2021  
 Accepted 30.05.2021

# МИКРОБНЫЕ АГЕНТЫ КАК ТРИГГЕРЫ РАЗВИТИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

А.В. Лапштаева<sup>1</sup>, Ю.Г. Абросимова<sup>2</sup>, Т.Я. Еремкина<sup>1</sup>, Ю.А. Костина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

**Резюме.** Рассеянный склероз (РС) в настоящее время является актуальной медико-социальной проблемой. Это обусловлено высокой распространенностью данной патологии среди неврологических заболеваний с преимущественным поражением лиц молодого возраста и последующей стремительной инвалидизацией. Данное заболевание все еще остается загадкой медицины ввиду своей неоднозначной этиологии, полиморфизма клинических проявлений и нестабильного течения. Несмотря на значительное развитие современных инструментальных методов диагностики, для рассеянного склероза до сих пор не были выявлены патогномичные признаки, позволяющие с высокой точностью диагностировать заболевание на ранних этапах. В настоящий момент с уверенностью можно сказать лишь о том, что РС является нейродегенеративным заболеванием, сопровождающимся демиелинизацией и гибелью нервных клеток. Сложные и разнообразные патогенетические механизмы позволяют предположить мультифакториальный характер заболевания, которое развивается при сочетании внешних факторов и наследственной предрасположенности, обуславливающей нарушение иммунной толерантности. Наиболее обоснованной является полигенная теория возникновения РС, подразумевающая, что генотип больных РС состоит из множества генов, каждый из которых вносит свою лепту в развитие заболевания. Было выявлено более 100 генов, ассоциированных с РС, среди которых особое место занимает HLA-система (human leukocyte antigen), контролирующая взаимодействие иммунокомпетентных клеток и осуществляющая иммунный ответ. Кроме этого, идентифицированы новые гены-кандидаты, способствующие развитию РС: гены рецепторов интерлейкина-2 и -7 (IL-2R, IL-7R), кластеров дифференцировки 6 (CD6) и 58 (CD58), фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), регуляторного фактора интерферона 8 (IRF8), интерлейкина-12A (IL-12A) и другие. Однако для реализации генетической предрасположенности необходимо воздействие внешних триггерных факторов. Активация демиелинизирующего процесса довольно часто инициируется различными инфекционными агентами, среди которых наиболее изучены вирусы Эпштейна–Барр, Джона Каннингема, острого энцефаломиелимита, человеческие эндогенные ретровирусы. Особую роль в развитии нейродегенеративных нарушений играет изменение микробиоты кишечника за счет таких микроорганизмов, как *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacteroides*, *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Данный дисбаланс оказывает значительное влияние на функционирование иммунной и нервной систем, поскольку микробиота принимает участие в процессах нейрогенеза, миелинизации, активации клеточного и гуморального типов иммунного ответа. В настоящем обзоре представлены и проанализированы последние данные отечественной и зарубежной литературы, посвященной изучению эпидемиологических особенностей РС, а также микробиологических факторов риска развития заболевания.

**Ключевые слова:** рассеянный склероз, нервные клетки, генетическая предрасположенность, демиелинизация, воспаление, микробиота, бактерии, вирусы.

---

**Адрес для переписки:**

Лапштаева Анна Васильевна  
430005, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск,  
ул. Большевикская, 68, ФГБОУ ВО Мордовский  
государственный университет им. Н.П. Огарева.  
Тел.: 8 927 177-35-55.  
E-mail: av\_lapshtaeva@mail.ru

**Contacts:**

Anna V. Lapshtaeva  
430005, Russian Federation, Republic of Mordovia, Saransk,  
Bolshevistskaya str., 68, Ogarev Mordovia State University.  
Phone: +7 927 177-35-55.  
E-mail: av\_lapshtaeva@mail.ru

**Для цитирования:**

Лапштаева А.В., Абросимова Ю.Г., Еремкина Т.Я., Костина Ю.А.  
Микробные агенты как триггеры развития рассеянного  
склероза // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1050–1056.  
doi: 10.15789/2220-7619-MAA-1656

**Citation:**

Lapshtaeva A.V., Abrosimova Yu.G., Eremkina T.Ya., Kostina Yu.A. Microbial  
agents as triggers of developing multiple sclerosis // Russian Journal  
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6,  
pp. 1050–1056. doi: 10.15789/2220-7619-MAA-1656

## MICROBIAL AGENTS AS TRIGGERS OF DEVELOPING MULTIPLE SCLEROSIS

Lapshataeva A.V.<sup>a</sup>, Abrosimova Yu.G.<sup>b</sup>, Eremkina T.Ya.<sup>a</sup>, Kostina Yu.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

<sup>b</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Multiple sclerosis (MS) currently represents a pressing medical and social issue. This is due to the high prevalence of this pathology among neurological diseases preferentially affecting young people and subsequent rapid disability. This disease still remains a mystery for medicine due to its ambiguous etiology, polymorphism of clinical manifestations and unstable course. Despite the marked development of modern instrumental diagnostic methods, pathognomonic signs have not yet been identified for multiple sclerosis allowing to diagnose the disease with high accuracy at early stages. At the moment, we may only say with confidence that MS is a neurodegenerative disease accompanied by rapid demyelination and death of nerve cells. Complex and diverse pathogenetic mechanisms suggest a multifactorial nature of the disease, which develops due to combination of external factors and hereditary predisposition, which causes altered immune tolerance. The polygenic theory of MS is most substantiated, which implies that the genotype of MS patients consists of many genes, each of which contributes to the disease development. More than 100 genes associated with MS have been identified, among which a special place is taken by the HLA system (human leukocyte antigen), which controls the interaction of immunocompetent cells and carries out an immune response. In addition, new candidate genes have been identified that contribute to the development of MS: interleukin 2 and 7 receptors (IL-2R, IL-7R), differentiation cluster 6 (CD6) and 58 (CD58), tumor necrosis factor  $\alpha$ , interferon regulatory factor 8 (IRF8), interleukin 12A (IL-12A) and others. However, to uncover genetic predisposition, it is necessary to experience external trigger factors. The activation of demyelinating process is quite often initiated by various infectious agents, among which the most studied are Epstein–Barr virus, John Cunningham virus, acute encephalomyelitis virus, and human endogenous retroviruses. Intestinal microbiota altered by *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacteroides*, *Proteobacteria* and *Firmicutes* deserved special attention in developing neurodegenerative disorders. Such an imbalance profoundly affects immune and nervous system functioning, taking part in neurogenesis, myelination, activation of cellular and humoral immune responses. Here we review and analyze the latest data accumulated in Russian and foreign literature regarding the study of the MS epidemiological features, as well as microbiological risk factors for disease development.

**Key words:** multiple sclerosis, nerve cell, genetic predisposition, demyelination, inflammation, viruses, microbiota, bacteria, viruses.

Рассеянный склероз (РС) — это хроническое, демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы (ЦНС), обусловленное аутоиммунно-воспалительными и нейродегенеративными процессами и характеризующееся полиморфизмом клинических проявлений. РС — одно из наиболее распространенных органических поражений головного и спинного мозга. По данным систематического анализа Global Burden of Disease Study, в 2016 г. во всем мире зарегистрировано 2 221 188 случаев заболевания [27]. Для эпидемиологии РС характерен феномен «градиента широты», то есть увеличение распространенности заболевания по мере удаления от экватора [29]. Максимальная распространенность РС (более 200 случаев на 100 тыс. жителей) зарегистрирована в Шотландии и Северной Ирландии, на острове Сицилия. Наиболее высокие показатели отмечаются в странах Северной Америки и Западной Европы (164,6 и 127,0 случаев на 100 тыс. населения соответственно) [27]. К зонам низкого риска развития заболевания относятся Восточная Азия, Тропическая Африка и острова Карибского моря (2,2, 2,1 и 0,3–1,9 случаев на 100 тыс. населения соответственно) [31]. В Российской Федерации в большинстве регионов распространенность множественного склероза составляет 25–70 случаев заболевания на 100 тыс. жителей [14], и, по последним данным, в стране насчитывается около 30–45 тыс. больных [3].

В настоящее время во многих странах мира наблюдается увеличение частоты РС: так, с 1990 г. заболеваемость в мире увеличилась на 10,4%. В России в период с 2017 по 2019 г. заболеваемость возросла почти в 2 раза [3]. Необходимо отметить, что в последние годы рост заболеваемости сопровождается расширением возрастных рамок дебюта РС в сторону лиц молодого возраста [7], что приводит к снижению качества жизни трудоспособного населения и раннему развитию инвалидизации. У большинства больных в течение первых 5 лет болезни отмечается значительное ухудшение качества жизни, а через 16 лет наблюдается утрата способности к самообслуживанию и передвижению [10]. По данным Scalfari A. и соавт., для пациентов с РС характерно снижение продолжительности жизни, а также увеличение смертности в 1,5–2 раза по сравнению с общей популяцией [37]. Таким образом, РС остается одной из наиболее сложных медико-социальных проблем.

Несмотря на активное изучение заболевания, вопросы этиологии РС к настоящему времени остаются окончательно не решенными. Сложные и разнообразные патогенетические механизмы позволяют предположить мультифакториальный характер заболевания, которое развивается при сочетании внешних факторов (вирусные агенты, изменение кишечной микробиоты, гиповитаминозы D и A, ожирение,

курение) и наследственной предрасположенности, обуславливающей нарушение иммунной толерантности.

Настоящий обзор содержит результаты анализа данных отечественной и зарубежной литературы, посвященной изучению микробных факторов риска развития РС.

На сегодняшний день выявлено более 100 генов, ассоциированных с предрасположенностью к развитию РС [18, 36]. Наиболее обоснованной является полигенная теория, подразумевающая то, что генотип больных РС состоит из множества генов, каждый из которых вносит свою лепту в развитие заболевания.

Важную роль играют гены главного комплекса гистосовместимости МНС (major histocompatibility complex), локализованные на коротком плече 6-й аутосомной хромосомы. К данному комплексу относится система HLA (human leukocyte antigen), которая контролирует взаимодействие иммунокомпетентных клеток, распознавание собственных и чужеродных клеток и осуществление иммунного ответа [38, 13, 11]. Гены МНС имеют те же обозначения, что и HLA-антигены, и включают в себя одну или несколько букв, обозначающих ген, и цифру, обозначающую аллель данного гена [12]. Наиболее изученным является ген *HLA-DRB1*. Носительство аллеля *HLA-DRB1\*15:01* увеличивает риск развития РС в 3 раза [18, 36]. Протективными в отношении развития РС являются аллели *HLA-DRB1\*14* в северо-европейской популяции и *HLA-DRB1\*01*, *HLA-DRB1\*07*, *HLA-DRB1\*11* у европеоидов [8]. В исследовании Кулаковой О.Г. и соавт. аллели *HLA-DRB1\*01*, *HLA-DRB1\*17* и *HLA-DRB1\*11* ассоциированы с развитием РС у русских [9]. В иранской популяции выявлена ассоциация между аллелями *HLA-DRB1\*07*, *HLA-DRB1\*11* и *HLA-DRB1\*15* с развитием первично-прогрессирующего РС [38]. Также имеются данные о протективном влиянии *HLA-DQB1* на презентацию белка миелина при РС. Выделяют около 66 однонуклеотидных полиморфизмов гена, которые с наибольшей частотой встречаются у европейцев, реже — у африканцев и азиатов [5].

Методом исследования общегеномных ассоциаций идентифицированы новые гены-кандидаты, способствующие развитию РС, такие как ген рецептора IL-2 (*IL-2R*), рецептора IL-7 (*IL-7R*), С-типа лектина домена семейства 16 (*CLEC16A*), кластеров дифференцировки 6 (*CD6*) и 58 (*CD58*), регуляторного фактора интерферона 8 (*IRF8*), IL-12A, транскрипционного фактора 3 олигодендроцитов и индуцируемого фактором некроза опухоли  $\alpha$  белка 3 (*Olig3-TNFAIP3*), ген рецептора 4 простагландина E (*PTGER4*), регулятора сигнального пути G-белка (*RGS1*) и члена суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 1A

(*TNFRSF1A*) [25]. Важным направлением является проведение дальнейших масштабных исследований, позволяющих определить вклад данных генов в развитие заболевания.

Однако для реализации генетической предрасположенности необходимо воздействие внешних факторов. Активация демиелинизирующего процесса довольно часто инициируется различными вирусами. Влияние инфекционного фактора на развитие РС подтверждается высоким титром в крови и ликворе больных антител к простому вирусу герпеса 1 и 2 (*Herpes simplex virus 1,2* [*HSV-1,2*]), вирусу Эпштейна–Барр (*Epstein–Barr virus* [*EBV*]), цитомегаловирусу (*Human cytomegalovirus*), вирусу гриппа С (*Influenza virus C*), вирусу парагриппа (*Parainfluenza virus*) [6].

Особое значение придается EBV. Существует мнение, что РС не развивается без данного вируса, однако, в свою очередь, инфицирования недостаточно для развития заболевания [17]. Согласно последним данным, инфицирование вирусом в детском возрасте увеличивает риск развития РС в 15 раз, в подростковом и среднем возрасте — в 30 раз [30]. В основе пускового механизма лежит феномен молекулярной мимикрии: сходство антигенных эпитопов вируса с белками миелина человека приводит к взаимодействию аутоагрессивных Т-лимфоцитов с антигенами собственного миелина ЦНС, оказывая повреждающее действие [33]. В одном из исследований было установлено, что большинство больных РС имеют высокий уровень антител к капсидному антигену (анти-VCA IgG) и к ядерному антигену вируса (анти-EBNA-1 IgG). Необходимо отметить, что высокий титр анти-VCA IgG был ассоциирован с носительством гена *HLA-DRB1*, что доказывает роль генетической предрасположенности в развитии заболевания [40].

В последние годы особое внимание сосредоточено на изучении влияния человеческих эндогенных ретровирусов (HERV) на развитие РС. Предполагают, что HERV вносят вклад в патогенез аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний, так как способны влиять на экспрессию генов, прежде всего системы HLA, а также приводить к нарушению иммунной толерантности. Активировать ретровирус могут инфекционные агенты, а также химические и физические факторы внешней среды. Имеются данные, что EBV, находясь в латентном состоянии, ассоциирован в организме с HERV и способствует его активации. Активный HERV может вызывать процессы демиелинизации и прогрессирование РС [28].

Среди других инфекционных агентов, предположительно влияющих на возникновение РС, особое внимание привлекают штаммы ма-

лоизученного вируса острого энцефаломиелита человека (НАЕВ), относящегося к семейству *Rhabdoviridae* и имеющего сходную молекулярно-генетическую структуру с вирусом бешенства. НАЕВ был обнаружен в спинномозговой жидкости и крови больных множественным склерозом. Следует отметить, что у 28% пациентов выявлены вирус-нейтрализующие антитела в высоком титре, несмотря на то что никто из них не был вакцинирован против бешенства, а также отмечалась активация клеточного звена иммунитета к НАЕВ в стадии обострения [4]. Однако ввиду малого количества исследований в отношении вируса на данный момент невозможно достоверно утверждать, что он ассоциирован с развитием РС.

Ряд авторов высказали предположение, что ДНК-содержащий вирус Джона Каннингема (John Cunningham (JC) virus) может являться триггером развития РС. 70–90% населения инфицированы данным вирусом: первичное заражение происходит, как правило, в детском возрасте и протекает бессимптомно. При выраженном угнетении Т-клеточного звена иммунитета происходит реактивация вируса Джона Каннингема и проникновение его в ЦНС, что вызывает лизис олигодендроцитов и демиелинизацию. Следы данного вируса обнаружены в тканях головного мозга пациентов, страдающих РС. По данным Mazzoni E. и соавт., титр антител IgG к эпитомам JCPyV VP1 у пациентов с РС на 50% ниже, чем у здоровых людей, что свидетельствует о недостаточности гуморального иммунного ответа на антигены JCPyV VP1 и специфических иммунных нарушениях у данной группы пациентов [34].

Особую роль в развитии нейродегенеративных нарушений играет изменение микробиоты кишечника. Известно тесное взаимодействие между кишечной микробиотой и ЦНС. Доказано, что кишечная микробиота посредством нейротрансмиттеров, нейрометаболитов, микробных соединений принимает активное участие в процессах нейрогенеза, миелинизации, активации микроглии, что может являться важным аспектом в патогенезе РС [21]. Также микробиота оказывает значимое влияние на функционирование иммунной системы человека. Так, клеточный и гуморальный типы иммунного ответа могут активироваться представителями кишечной микрофлоры. Например, сегментированные нитчатые бактерии стимулируют дифференцировку аутореактивных Т-хелперов 17-го типа (Th17) [23]. Причем на спектр продуцируемых лимфоцитами цитокинов влияет вид микроорганизма: при распознавании *Candida albicans* Th17 может продуцировать интерлейкин-17 (IL-17) и интерферон  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), *Staphylococcus aureus* — IL-17 и IL-10 [42].

В исследованиях ряда авторов установлено, что кишечная микрофлора при РС значительно отличается от микробиоценоза у здоровых лиц. По данным Chen J., у больных РС отмечалось преобладание бактериоидов *Pedobacter* и *Flavobacterium*, фирмикутов *Blautia* и *Dorea*, протеобактерий *Pseudomonas* и *Mycoplana*, а содержание *Parabacteroides*, *Erysipelotrichaceae*, *Lachnospiraceae*, *Veillonellaceae*, *Haemophilus* было ниже, чем у здоровых [22]. В работе Jangi S. и соавт. при заболевании отмечалось увеличение в составе микробиоценоза кишечника числа бактерий рода *Acinetobacter* и снижение доли рода *Bacteroides* [26]. Более детальное изучение микробиома, проведенное в 2017 г. в США, показало, что у больных с РС также наблюдается уменьшение *Parabacteroides distasonis* и увеличение содержания *Acinetobacter calcoaceticus* и муцин-редуцирующих бактерий *Akkermansia muciniphila*, которые, уменьшая количество муцина, основного компонента слизи, приводят к повышению проницаемости стенки кишечника, проникновению микробов в несвойственные им ниши и взаимодействию клеток иммунной системы с микроорганизмами [20]. Транслокация бактерий под базальную мембрану эпителиальных пластов служит пусковым механизмом дифференцировки наивных Т-лимфоцитов в Th17 [16].

В ходе дальнейших экспериментов также было доказано влияние *A. calcoaceticus* на иммунную регуляцию в виде снижения содержания регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) и увеличения содержания Т-хелперов 1-го типа (Th1), продуцирующих противовоспалительные цитокины, особенно IL-10. По данным Bereng K. и соавт., колонизация стерильных мышей микробиотой кишечника больных РС способствует развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) — животной модели РС, напоминающей его патологические, клинические и иммунологические особенности, а также вызывает более агрессивное течение заболевания, что может быть связано с отсутствием у грызунов в мезентериальных лимфатических узлах Т-лимфоцитов [19].

Наиболее редко, у 11% больных, выявлялись *Clostridium* spp., однако отмечалась их связь с более тяжелым течением заболевания. Установлено, что продуцируемый *C. perfringens*  $\epsilon$ -токсин способен преодолевать гематоэнцефалический барьер, вызывать повреждение нейронов мозжечка, гибель олигодендроцитов и демиелинизацию [32].

У больных РС с большей длительностью и тяжестью заболевания отмечается увеличение количества бактерий рода *Bifidobacterium*, тесно взаимосвязанных с количеством Th17 [1]. При изменении кишечного микробиома Т-лимфоциты способны менять свой фенотип и функцио-

нальную активность, что приводит к иммунному дисбалансу и предрасполагает к развитию аутоиммунных заболеваний [39]. Содержание бактерий рода *Lactobacillus* у пациентов с РС, наоборот, было более низким. Показано, что при незначительной доле данных микроорганизмов в составе микробиоценоза кишечника наблюдается увеличение аутореактивных популяций Th17 — DP Th17 [2]. Интересно, что использование *Lactobacillus helveticus* SBT2171 (LN2171) оказывало положительное влияние на клиническое течение ЭАЭ у мышей, заметно снижая продукцию IL-6, последующую дифференцировку Th17 и инфильтрацию ЦНС [41].

Говоря о составе микробиоты, нельзя не упомянуть о грибах рода *Candida* spp., которые являются представителями нормальной микрофлоры кишечника. При длительном РС уровень *Candida* spp. увеличивается, однако многие авторы считают это результатом развивающегося дисбиоза [2, 35].

Таким образом, в настоящее время важность роли микробиоты кишечника в развитии РС не подвергается сомнению. Однако данных об особенностях состава микробиома больных недостаточно для установления связи с этиопатогенезом данного заболевания. Коррекция

состава микробиоценоза оказывала влияние на течение РС, поэтому дальнейшее изучение данного вопроса может способствовать развитию нового направления терапии РС.

Анализ результатов отечественных и зарубежных исследований показал, что РС является полиэтиологическим заболеванием. Достоверным фактором развития заболевания считается наследственная предрасположенность, на фоне которой развиваются аутоиммунные реакции, приводящие к демиелинизации и нейродегенерации ЦНС. Реализация данных механизмов чаще всего инициируется множеством триггерных факторов, основными из которых являются активные герпесвирусные инфекции. Прочие факторы, такие как HERV, HAEV, изменение микробиоты, безусловно, влияют на течение РС, однако для определения достоверной связи с причиной возникновения РС недостаточно данных. Дальнейшее изучение иммуноопосредованных механизмов и роли факторов окружающей среды в патогенезе демиелинизации нервной ткани позволит найти новые подходы в лечении и обозначить методы своевременной диагностики и профилактики РС, приводящего к столь тяжелым неврологическим нарушениям и высокой инвалидизации молодого населения.

## Список литературы/References

1. Абдурасулова И.Н., Ермоленко Е.И., Мацулевич А.В., Абдурасулова К.О., Тарасова Е.А., Кудрявцев И.В., Бисага Г.Н., Суворов А.Н., Клименко В.М. Влияние пробиотических энтерококков и глатирамера ацетата на тяжесть экспериментального аллергического энцефаломиелита у крыс // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2016. Т. 102, № 4. С. 463–479. [Abdurasulova I.N., Ermolenko E.I., Matsulevich A.V., Abdurasulova K.O., Tarasova E.A., Kudryavtsev I.V., Bisaga G.N., Suvorov A.N., Klimenko V.M. Effect of probiotic enterococci and glatiramer acetate on the severity of experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*, 2016, vol. 102, no. 4, pp. 463–479. (In Russ.)]
2. Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Кудрявцев И.В., Негореева И.Г., Ильвес А.Г., Серебрякова М.К., Ермоленко Е.И., Ивашкова Е.В., Мацулевич А.В., Татаринов А.Е., Столяров И.Д., Клименко В.М., Суворов А.Н. Состав микробиоты кишечника и популяций циркулирующих Th-клеток у пациентов с рассеянным склерозом // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3. С. 504–522. [Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Kudryavtsev I.V., Negoreeva I.G., Ilves A.G., Serebriakova M.K., Ermolenko E.I., Ivashkova E.V., Matsulevich A.V., Tatarinov A.E., Stoliarov I.D., Klimenko V.M., Suvorov A.N. Intestinal microbiota composition and peripheral blood Th cell subsets in patients with multiple sclerosis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 3, pp. 504–522. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-504-522
3. Акоюн К.Г., Благовестная Е.И., Иванов С.В. Структура и развитие рассеянного склероза в г. Симферополь Республики Крым за 2017–2019 гг. // Modern Science. 2020. Т. 2, № 1. С. 202–207. [Akopjan K.G., Blagovestnaja E.I., Ivanov S.V. Structure and development of multiple sclerosis in Simferopol, Republic of Crimea for 2017–2019. *Modern Science*, 2020, vol. 2, no. 1, pp. 202–207. (In Russ.)]
4. Баринский И.Ф., Гребенникова Т.В., Альховский С.В., Кочергин-Никитский К.С., Сергеев О.В., Грибенча С.В., Раев С.А. Молекулярно-генетическая характеристика вируса, выделенного от больных острым энцефаломиелитом человека и множественным склерозом // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, № 4. С. 14–18. [Barinsky I.F., Grebennikova T.V., Alkhovskiy S.V., Kochergin-Nikitsky K.S., Sergeev O.V., Gribencha S.V., Raev S.A. Molecular genetic characteristics of the virus isolated from patients with human acute encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2015, vol. 60, no. 4, pp. 14–18. (In Russ.)]
5. Быкадоров П.А., Опарина Н.Ю., Фридман М.В., Макеев В.Ю. Лocus, влияющий на экспрессию антигенов HLA в участке 14-й хромосомы, ассоциированном с развитием рассеянного склероза, и функции расположенных в них генов // Генетика. 2017. Т. 53, № 9. С. 1035–1041. [Bykadorov P.A., Oparina N.Ju., Fridman M.V., Makeev V.Yu. Prevalent function of genome loci associated with development of multiple sclerosis as revealed by GWAS and eQTL analysis. *Genetika = Russian Journal of Genetics*, 2017, vol. 53, no. 9, pp. 1035–1041. (In Russ.)] doi: 10.7868/S0016675817090053
6. Гончарова З.А., Беловолова Р.А., Мегерян В.А. Клинико-иммунологические особенности рассеянного склероза на фоне реактивации персистирующей герпесвирусной инфекции // Саратовский научно-медицинский журнал. 2018. Т. 14, № 1. С. 126–132. [Goncharova Z.A., Belovolova R.A., Megerjan V.A. Clinical and immunological features of multiple sclerosis combined with persistent herpes viral infection. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Medical Journal*, 2018, vol. 14, no. 1, pp. 126–132. (In Russ.)]

7. Гончарова З.А., Ужахов Р.М. Анализ распространенности и факторы риска развития рассеянного склероза в Республике Ингушетия // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017. Т. 117, № 2. С. 6–9. [Goncharova Z.A., Uzhahov R.M. An analysis of the prevalence and risk factors of multiple sclerosis in the republic of Ingushetia. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2017, vol. 117, no. 2, pp. 6–9. (In Russ.)] doi: 10.17116/jnevro2017117226-9
8. Захарова М.Ю., Белянина Т.А., Соколов А.В., Киселев И.С., Мамедов А.Э. Вклад генов главного комплекса гистосовместимости класса II в предрасположенность к аутоиммунным заболеваниям // Acta Naturae. 2019. Т. 11, № 4. С. 4–12. [Zakharova M.Yu., Belyanina T.A., Sokolov A.V., Kiselev I.S., Mamedov A.E. The contribution of major histocompatibility complex class II genes to an association with autoimmune diseases. *Acta Naturae*, 2019, vol. 11, no. 4, pp. 4–12. (In Russ.)] doi: 10.32607/20758251-2019-11-4-4-12
9. Кулакова О.Г., Башинская В.В., Царева Е.Ю., Бойко А.Н., Фаворова О.О., Гусев Е.И. Анализ ассоциации полиморфизма генов, кодирующих рецепторы цитокинов, с клиническими характеристиками рассеянного склероза // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2016. Т. 10, № 2. С. 10–15. [Kulakova O.G., Bashinskaya V.V., Tsareva E.Yu., Boyko A.N., Favorova O.O., Gusev E.I. Association analysis of cytokine receptors' genes polymorphisms with clinical features of multiple sclerosis. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2016, vol. 10, no. 2, pp. 10–15. (In Russ.)] doi: 10.17116/jnevro201611610210-15
10. Лорина Л.В., Джапаралиева Н.Т., Буршинов А.О. Показатели качества жизни при различных типах течения рассеянного склероза // Медицина. 2017. Т. 5, № 2. С. 88–96. [Lorina L.V., Dzhaparaliev N.T., Burshinov A.O. Quality of life indicators in different types of multiple sclerosis. *Medsitsina = Medicine*, 2017, vol. 5, no. 2, pp. 88–96. (In Russ.)]
11. Насибуллин Т.Р., Туктарова И.А., Эрдман В.В., Тимашева Я.Р., Заплахова О.В., Бахтиярова К.З., Мустафина О.Е. Ассоциации полиморфных ДНК-маркеров с рассеянным склерозом в этнической группе башкир // Биомика. 2018. Т. 10, № 3. С. 319–326. [Nasibullin T.R., Tuktarova I.A., Erdman V.V., Timasheva Y.R., Zaplakhova O.V., Bakhtiyarova K.Z., Mustafina O.E. Associations of polymorphic dna markers with multiple sclerosis in ethnic group of bashkirs. *Biomika = Biomics*, 2018, vol. 10, no. 3, pp. 319–326. (In Russ.)] doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-40
12. Семин Е.В., Блохин Б.М., Каграманова К.Г., Майорова О.А. Система HLA: строение, функции, очевидная и возможная связь с аутоиммунными и атопическими заболеваниями // Лечебное дело. 2012, № 1. С. 4–9. [Syomin E.V., Blokhin B.M., Kagramanova K.G., Mayorova O.A. HLA system: structure, functions, obvious and possible association with autoimmune and atopic diseases. *Lechebnoe delo = Medical Care*, 2012, no. 1, pp. 4–9. (In Russ.)]
13. Смагина И.В., Ельчанинова С.А., Бодрова Ю.В. Связь полиморфизма генов иммунной системы с особенностями течения рассеянного склероза // Бюллетень медицинской науки. 2017. № 1. С. 70–74. [Smagina I.V., Yelchaninova S.A., Bodrova Yu.V. The connection between immune system genes and special features of the course of multiple sclerosis. *Bulleten' meditsinskoy nauki = Bulletin of Medical Science*, 2017, no. 1, pp. 63–67. (In Russ.)] doi: 10.31684/2541-8475.2017.1(5).70-74
14. Толкушин А.Г., Смирнова А.В., Давыдовская М.В., Ермолаева Т.Н., Андреев Д.А., Кокушкин К.А. Бремя рассеянного склероза в России и Европе: где больше? // Фармакоэкономика: теория и практика. 2018. Т. 6, № 2. С. 25–30. [Tolkushin A.G., Smirnova A.V., Davydovskaya M.V., Ermolaeva T.N., Andreev D.A., Kokushkin K.A. The burden of multiple sclerosis in Russia and Europe: what's above? *Farmakoeconomika: teoria i praktika = Pharmacoeconomics: Theory and Practice*, 2018, vol. 6, no. 2, pp. 25–30. (In Russ.)] doi: 10.30809/phe.2.2018.4
15. Ascherio A., Munger K.L., White R., Köchert K., Simon K.C., Polman C.H., Freedman M.S., Hartung H.P., Miller D.H., Montalbán X., Edan G., Barkhof F., Pleimes D., Radü E.W., Sandbrink R., Kappos L., Pohl C. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurology*, 2014, vol. 71, no. 3, pp. 306–314. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.5993
16. Atarashi K., Tanoue T., Shima T., Imaoka A., Kuwahara T., Momose Y., Cheng G., Yamasaki S., Saito T., Ohba Y., Taniguchi T., Takeda K., Hori S., Ivanov I.I., Umesaki Y., Itoh K., Honda K. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*, 2011, vol. 331, no. 6015, pp. 337–341. doi: 10.1126/science.1198469
17. Bar-Or A., Pender M., Khanna R., Steinman L., Hartung H.P., Maniar T., Croze E., Aftab B.T., Giovannoni G., Joshi M.A. Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: theory and emerging immunotherapies. *Trends Mol. Med.*, 2019, vol. 26, no. 3, pp. 296–310. doi: 10.1016/j.molmed.2019.11.003
18. Bashinskaya V.V., Kulakova O.G., Boyko A.N., Favorov A.V., Favorova O.O. A review of genome-wide association studies for multiple sclerosis: classical and hypothesis-driven approaches. *Hum. Genet.*, 2015, vol. 134, no. 11, pp. 1143–1162. doi: 10.1007/s00439-015-1601-2
19. Berer K., Gerdes L.A., Cekanaviciute E., Jia X., Xiao L., Xia Z., Liu C., Klotz L., Stauffer U., Baranzini S.E., Kämpfel T., Hohlfield R., Krishnamoorthy G., Wekerle H. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, vol. 114, no. 40, pp. 10719–10724. doi: 10.1073/pnas.1711233114
20. Cekanaviciute E., Yoo B.B., Runia T.F., Debelius J.W., Singh S., Nelson C.A., Kanner R., Bencosme Y., Lee Y.K., Hauser S.L., Crabtree-Hartman E., Sand I.K., Gacias M., Zhu Y., Casaccia P., Cree B.A., Knight R., Mazmanian S.K., Baranzini E. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, vol. 114, no. 40, pp. 10713–10718. doi: 10.1073/pnas.1711235114
21. Chandra S., Alam M.T., Dey J., Sasidharan C.P., Ray U., Srivastava A.K., Gandhi S., Tripathi P.P. Healthy gut, healthy brain: the gut microbiome in neurodegenerative disorders. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2020, vol. 20, no. 13, pp. 1142–1153. doi: 10.2174/1568026620666200413091101
22. Chen J., Chia N., Kalari K.R., Yao J.Z., Novotna M., Soldan M.P., Luckey D.H., Marietta E.V., Jeraldo P.R., Chen X., Weinshenker B.G., Rodriguez M., Kantarci O.H., Nelson H., Murray J.A., Mangalam A.K. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6: 28484. doi: 10.1038/srep28484
23. Gaboriau-Routhiau V., Rakotobe S., Lécuyer E., Mulder I., Lan A., Bridonneau C., Rochet V., Pisi A., De Paepe M., Brandi G., Eberl G., Snel J., Kelly D., Cerf-Bennsussan N. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*, 2009, vol. 31, no. 4, pp. 677–689. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.020
24. Guzik T.J., Skiba D.S., Touyz R.M., Harrison D.G. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovasc. Res.*, 2017, vol. 113, no. 9, pp. 1009–1023. doi: 10.1093/cvr/cvx108
25. Hohlfield R.ECTRIMS lecture: future challenges in MS. *Multiple Sclerosis*, 2009, vol. 16, no. 1, pp. 3–14. doi: 10.1177/1352458509357355

26. Jangi S., Gandhi R., Cox L.M., Ning L.N., Glehn F., Yan R., Patel B., Mazzola M.A., Liu S., Glanz B.L., Cook S., Tankou S., Stuart F., Melo K., Nejad P., Smith K., Topçuoğlu B.D., Holden J., Kivisäkk P., Chitnis T., De Jager P.L., Quintana F.J., Gerber G.K., Bry L., Weiner H.L. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat. Commun.*, 2016, vol. 7, pp. 12–15. doi: 10.1038/ncomms12015 42
27. Kha M.T., Wallin M., Culpepper W., Nichols E., Bhutta Z., Gebrehiwot T., Hay S., Khalil I., Krohn K.J., Liang X., Naghavi M., Mokdad A., Nixon M., Reiner R., Sartorius B., Smith M., Topor-Madry R., Werdecker A., Vos T., Feigin V., Murray C.J. Global regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.*, 2019, vol. 18, pp. 269–285. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30443-5
28. Kuri P., Nath A., Créange A., Dolei A., Marche P., Gold J., Giovannoni G., Hartung H.P., Perron H. Human endogenous retroviruses in neurological diseases. *Trends Mol. Med.*, 2018, vol. 24, pp. 379–394. doi: 10.1016/j.molmed
29. Kurtzke J.F. Multiple sclerosis in time and space geographic clues to cause. *J. Neurovirol.*, 2000, vol. 6, no. 2, pp. 134–140.
30. Leray E., Moreau T., Fromont A., Edan G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev. Neurol. (Paris)*, 2016, vol. 172, no. 1, pp. 3–13. doi: 10.1016/j.neurol.2015.10.006
31. Leray E., Vukusic S., Debouverie M., Clanet M., Brochet B., Sèze J., Zéphir H., Defer G., Lebrun-Frenay C., Moreau T., Clavelou P., Pelletier J., Berger E., Cabre P., Camdessanché J.F., Kalson-Ray S., Confavreux C., Edan G. Excess mortality in patients with multiple sclerosis starts at 20 years from clinical onset: data from a large-scale French observational study. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 7: e0132033. doi: 10.1371/journal.pone.0132033
32. Linden J.R., Ma Y., Zhao B., Harris J.M., Rumah K.R., Schaeren-Wiemers N., Vartanian T. Clostridium perfringens epsilon toxin causes selective death of mature oligodendrocytes and central nervous system demyelination. *mBio*, 2015, vol. 6, no. 3: e02513. doi: 10.1128/mBio.02513-14
33. Lyndsey J.W., de Gannes S.L., Pate K.A., Zhao X. Antibodies specific for Epstein–Barr virus nuclear antigen-1 cross-react with human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *Mol. Immunol.*, 2016, vol. 69, pp. 7–12. doi: 10.1016/j.molimm.2015.11.007
34. Mazzoni E., Bononi I., Pietrobon S., Torreggiani E., Rossini M., Pugliatti M., Casetta I., Castellazzi M., Granieri E., Guerra G., Martini F., Tognon M. Specific antibodies reacting to JC polyomavirus capsid protein mimotopes in sera from multiple sclerosis and other neurological diseases-affected patients. *J. Cell. Physiol.*, 2020, vol. 235, no. 7, pp. 5847–5855. doi: 10.1002/jcp.29533
35. Saroukolaei S.A., Ghabaee M., Shokri H., Badiei A., Ghourchian S. The role of Candida albicans in the severity of multiple sclerosis. *Mycoses*, 2016, vol. 59, no. 11, pp. 697–704. doi: 10.1111/myc.12489
36. Sawser S., Franklin R.J., Ban M. Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol.*, 2014, vol. 13, no. 7, pp. 700–709. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70041-9
37. Scalfari A., Knappertz V., Cutter G., Goodin D.S., Ashton R., Ebers G.C. Mortality in patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 2013, vol. 81, no. 2, pp. 184–192. doi: 10.1212/WNL.0b013e31829a3388
38. Shahbazi M., Sadeghi S., Abadi A., Koochakili M., Amiri H., Kohansal R., Baghbanian S.M., Zamani M. Combination of interleukin-10 gene promoter polymorphisms with HLA-DRB1\*1501 allele is associated with multiple sclerosis. *Indian J. Med. Res.*, 2017, vol. 145, no. 6, pp. 746–752. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_1225\_15
39. Wacleche V.S., Goulet J.P., Gosselin A., Monteiro P., Soudeyns H., Fromentin R., Jenabian M.A., Vartanian S., Deeks S.G., Chomont N., Routy J.P., Ancuta P. New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy. *Retrovirology*, 2016, vol. 13, no. 1: 59. doi: 10.1186/s12977-016-0293-6
40. Xiao D., Ye X., Zhang N., Ou M., Guo C., Zhang B., Liu Y., Wang M., Yang G., Jing C. A meta-analysis of interaction between Epstein–Barr virus and HLA-DRB1\*1501 on risk of multiple sclerosis. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5: 18083. doi: 10.1038/srep18083
41. Yamashita M., Ukibe K., Matsubara Y., Hosoya T., Sakai F., Kon S., Arima Y., Murakami M., Nakagawa H., Miyazaki T. Lactobacillus helveticus SBT2171 attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 8: 2596. doi: 10.3389/fmicb.2017.02596
42. Zielinski C.E., Mele F., Aschenbrenner D., Jarrossay D., Ronchi F., Gattorno M., Monticelli S., Lanzavecchia A., Sallusto F. Pathogen-induced human T(H)17 cells produce IFN $\gamma$  or IL-10 and are regulated by IL-1 $\beta$ . *Nature*, 2012, vol. 484, no. 7395, pp. 514–518. doi: 10.1038/nature10957

**Авторы:**

**Лапштаева А.В.**, доцент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;

**Абросимова Ю.Г.**, ординатор кафедры клинической лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;

**Еремкина Т.Я.**, ординатор кафедры нервных болезней и психиатрии медицинского института ФГБОУ ВО Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;

**Костина Ю.А.**, доцент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия.

**Authors:**

**Lapshtaeva A.V.**, Associate Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology, Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;

**Abrosimova Yu.G.**, Resident Physician, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Faculty of Additional Professional Education, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

**Eremkina T.Ya.**, Resident Physician, Department of Nervous Diseases and Psychiatry of Medical Institute, Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;

**Kostina Yu.A.**, Associate Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology, Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation.

# МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ ВЭБ1/ВЭБ2 И ВГЧ6А/ВГЧ6В

М.И. Попкова<sup>1</sup>, О.В. Уткин<sup>1</sup>, Е.А. Соболева<sup>2</sup>, Н.А. Сахарнов<sup>1</sup>, Д.А. Брызгалова<sup>1</sup>,  
А.О. Сенатская<sup>1</sup>, Е.А. Кулова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

**Резюме.** В России из всего многообразия заболеваний ВЭБ- и ВГЧ6-этиологии официальной статистической отчетности подлежит только инфекционный мононуклеоз, что существенно затрудняет объективную оценку этиологической структуры, уровня заболеваемости, характеристики развития эпидемического процесса. В настоящее время сведения о генетической неоднородности ВЭБ, даже на уровне основных типов (ВЭБ1 и ВЭБ2), а также ВГЧ6А и ВГЧ6В, их распространенности и клиническом значении ограничиваются главным образом зарубежными данными. В России встречаются единичные публикации, посвященные данному вопросу. В то же время изучение циркуляции генетических типов (вариантов) и использование этой информации при осуществлении эпидемиологического надзора за некоторыми другими инфекциями уже вошло в повседневную практику. Одной из ключевых проблем является уровень развития лабораторного обеспечения молекулярно-генетического мониторинга. Цель данной работы — совершенствование методической базы дифференциальной детекции ВГЧ6А/В и основных типов ВЭБ. Материалом исследования послужили лейкоциты периферической крови детей в возрасте 1–15 лет с острым инфекционным мононуклеозом ( $n = 50$ ) и с отсутствием клинических симптомов данного заболевания ( $n = 29$ ). Выявление и количественное определение ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ6 выполняли с помощью метода ПЦР в реальном времени. Для дифференциального определения ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В в работе применялся оптимизированный однораундовый вариант ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. По результатам исследований частота выявления ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ6 при остром инфекционном мононуклеозе составила 74 и 72%, а в контрольной группе — 35 и 74% соответственно. Установлено, что у обследованных детей Нижегородского региона в вирусной популяции преобладают ВЭБ1 и ВГЧ6В, что согласуется с существующими представлениями об их географическом распределении на прилегающих территориях. ВЭБ2 был обнаружен в единственном образце только в контрольной группе. ВГЧ6А ни в одной из исследуемых групп выявлен не был. Оптимизированный в данной работе методический подход позволяет отдельно детектировать ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В по единому лабораторному протоколу, а в сочетании с дополнительным этапом концентрирования ДНК повышает диагностическую чувствительность ПЦР-анализа, минимизирует долю дискордантных и ложноотрицательных результатов. Такой комплексный подход может применяться в диагностических, эпидемиологических и научно-исследовательских целях.

**Ключевые слова:** ВЭБ1, ВЭБ2, ВГЧ6А, ВГЧ6В, вирусная нагрузка, ПЦР, гентипирование, дифференциальная детекция.

## Адрес для переписки:

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

## Contacts:

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

## Для цитирования:

Попкова М.И., Уткин О.В., Соболева Е.А., Сахарнов Н.А.,  
Брызгалова Д.А., Сенатская А.О., Кулова Е.А. Методические основы  
дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В // Инфекция  
и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1057–1066. doi: 10.15789/2220-7619-  
MBF-1661

## Citation:

Popkova M.I., Utkin O.V., Soboleva E.A., Sakharnov N.A., Bryzgalova D.A.,  
Senatskaia A.O., Kulova E.A. Methodological basics for differential  
detection of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B // Russian Journal of Infection  
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1057–1066.  
doi: 10.15789/2220-7619-MBF-1661

**METHODOLOGICAL BASICS FOR DIFFERENTIAL DETECTION OF EBV1/EBV2 AND HHV6A/HHV6B**Popkova M.I.<sup>a</sup>, Utkin O.V.<sup>a</sup>, Soboleva E.A.<sup>b</sup>, Sakharnov N.A.<sup>a</sup>, Bryzgalova D.A.<sup>a</sup>, Senatskaia A.O.<sup>a</sup>, Kulova E.A.<sup>b</sup><sup>a</sup> *Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation*<sup>b</sup> *Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation*

**Abstract.** Among a whole variety of EBV- and HHV6-linked diseases only infectious mononucleosis is subject to official statistical reporting in Russia that substantially complicates objective assessment of etiological structure, incidence rate, characteristics of developing epidemic process. Currently, the data on the genetic EBV heterogeneity, even at the level of the main types (EBV1 and EBV2), as well as HHV6A and HHV6B, prevalence and clinical importance are mainly limited to foreign research publications. Few publications assessing this issue are available in Russian scientific papers. At the same time, examining circulation of virus genetic types (variants) and use of such data in implementing epidemiological surveillance after some other infections have been commonly practiced. One of the key issues is the level of developed laboratory support for molecular genetic monitoring. The goal of the study was to improve methodological basics for differential detection of HHV6A/B and the major EBV types. There were used samples of peripheral blood leukocytes collected from children aged 1–15 years with acute ( $n = 50$ ) and asymptomatic infectious mononucleosis ( $n = 29$ ). The detection and quantification of EBV and HHV6 DNA was performed by using real-time PCR. For differential determination of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B, an optimized one-round PCR with electrophoretic agarose gel detection amplification products was used. The data from our own study showed that frequency of detected EBV and HHV6 DNA in acute infectious mononucleosis patients comprised 74 and 72% compared to control group reaching 35 and 74%, respectively. It was found that among the examined children of Nizhny Novgorod Region, EBV1 and HHV6B prevailed in the viral population that agrees with existing insights about their geographical distribution in the adjacent territories. EBV2 was found in a single sample only in the control group. HHV6A was not detected in any of the groups. The methodological approach optimized in this study allows to separately detect HHV6A/HHV6B and the main EBV types according to a unified laboratory protocol, whereas combining it with additional stage of DNA enrichment increases the diagnostic sensitivity of PCR analysis, minimizes proportion of discordant and false negative results. Such an integrated approach can be applied for diagnostic, epidemiological and research purposes.

**Key words:** EBV1, EBV2, HHV6A, HHV6B, viral load, PCR, genotyping, differential detection.

## Введение

На сегодняшний день сохраняют высокую актуальность и медико-социальную значимость инфекции и широкий спектр других нозологических форм заболеваний, в том числе онкологических, ассоциированных с вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ) и вирусами герпеса человека 6А и 6В (ВГЧ6А, ВГЧ6В) [5, 13, 20, 25]. Данные вирусы распространены повсеместно, но уровень заболеваемости на отдельных географических территориях может значительно варьировать [9].

В России из всего многообразия заболеваний ВЭБ- и ВГЧ6-этиологии официальной статистической отчетности подлежат только инфекционный мононуклеоз (ИМ) [7], что существенно затрудняет объективную оценку их этиологической структуры, уровня заболеваемости, характеристики развития эпидемического процесса. По данным отечественных исследователей, на долю классического ИМ ВЭБ-этиологии приходится 74,3%, а ВГЧ6А/В 6–14,5% всех случаев [3, 5]. В настоящее время повсеместно наблюдается повышение уровня заболеваемости ИМ [9], тенденция к увеличению случаев первичного инфицирования детей школьного и подросткового возраста с преобладанием у них тяжелых форм инфекции [10, 11]. За по-

следнее десятилетие в России наблюдался рост экономической значимости ИМ, а в 2018 г. экономический ущерб от заболеваемости ИМ составил 3,9 млрд рублей [7].

Достижения молекулярной биологии и развития молекулярно-генетических технологий позволяют постоянно обновлять и дополнять информацию о биологических особенностях ВЭБ и ВГЧ6А/В. По данным литературы, популяционная структура ВЭБ, циркулирующего во всем мире, характеризуется гетерогенностью как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей [17, 18, 19, 23, 29, 34]. Единой систематической картины генетических вариантов ВЭБ в настоящее время не существует. На основании выявленных различий в определенных генах вируса (BZLF1 [29], EBNA1 [17], EBNA2 [18], LMP1 [19, 23, 34]) предложено несколько классификаций.

В 2012 г. вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ6) был официально разделен Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) на два разных вида — ВГЧ6А и ВГЧ6В [14, 15]. С этого времени эксперты призывают ученых и врачей в дальнейших публикациях четко разграничивать эти два вида с целью стратификации клинических и биологических различий, а также дальнейшей детализации их классификации [14].

В настоящее время сведения о генетической неоднородности ВЭБ, даже на уровне основных типов (ВЭБ1 и ВЭБ2), а также ВГЧ6А и ВГЧ6В, их распространенности и клиническом значении ограничиваются главным образом зарубежными данными, которые нередко противоречивы [21, 24, 28, 32, 33]. В России встречаются единичные публикации, посвященные данному вопросу [1, 2, 4, 8]. В то же время изучение циркуляции генетических типов (вариантов) и использование этой информации при осуществлении эпидемиологического надзора за некоторыми инфекциями уже вошло в повседневную практику [7]. При этом одним из решающих аспектов является уровень развития методической базы для молекулярно-генетического анализа [12].

Целью данной работы было совершенствование методической базы для дифференциальной детекции ВГЧ6А/В и основных типов ВЭБ.

## Материалы и методы

Материалом для исследования послужила цельная периферическая кровь, стабилизированная  $K_3$ ЭДТА. Обследованию подлежали дети в возрасте 1–15 лет (медиана — 5 лет), госпитализированные в инфекционный стационар с клиническим диагнозом «острый инфекционный мононуклеоз» (ОИМ) ( $n = 50$ ). Из них лиц женского пола — 20, мужского — 30. У всех пациентов установлена средняя степень тяжести течения инфекции. Коллекцию образцов крови собирали в первые 3–10 дней от начала клинических проявлений. Контрольную группу составляли условно здоровые дети сопоставимого возраста и пола ( $n = 29$ ), у которых отсутствовали клинические признаки данного заболевания.

В работе использовались остаточные количества образцов, полученных для проведения стандартных диагностических исследований в клинической практике. Информированное согласие родителей или опекунов на проведение исследовательской работы в соответствии с Хельсинкской декларацией было получено лечащими врачами медицинских организаций.

**Пробоподготовка.** Для получения фракции лейкоцитов периферической крови использовали реагент «Гемолитик» (ЦНИИЭ, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

**Выделение ДНК.** Выделение тотальной ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ЦНИИЭ, Россия) согласно инструкции производителя. При оптимизации метода полученную общую нуклеиновую кислоту в некоторых пробах дополнительно концентри-

ровали, добавляя ацетат натрия (рН 7,0) и изопропанол. Осадок растворяли в 30 мкл РНК-буфера (ЦНИИЭ, Россия) и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до момента использования. Концентрацию и чистоту выделенной тотальной нуклеиновой кислоты измеряли с помощью спектрофотометра BioPhotometer Plus (Eppendorf, Германия).

**Количественное определение ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ6.** Выявление и количественное определение ДНК вирусов выполняли с помощью мультиплексной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением коммерческого набора «АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ЦНИИЭ, Россия) на амплификаторе Rotor-Gene Q 5plex HRM (Qiagen, Германия). Лабораторный протокол для ПЦР-РВ соблюдался согласно инструкции производителя. Результаты выражали в количественном формате — в логарифмах копий ДНК на  $10^5$  клеток ( $\lg$  ДНК/ $10^5$  клеток) и в копиях ДНК в пробе.

**Дифференциальная детекция ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В.** Для отдельной идентификации основных типов ВЭБ (ВЭБ1 и ВЭБ2) применяли двухраундовый («гнездовой») вариант ПЦР, описанный ранее [27, 31]. В первом раунде использовали внешнюю пару праймеров E2p1 (5'-AGG GAT GCCT GGA CAC AAG A-3') и E2p2 (5'-TGG TGC TGC TGG TGG TGG CAA T-3') и амплифицировали фрагмент гена EBNA-2 размером 596 п.н. Второй раунд ПЦР проводили в разных пробирках с использованием специфических пар праймеров Ap1 (5'-TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA-3') и Ap2 (5'-ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C-3'), амплифицирующих фрагмент 497 п.н., а также Bp1 (5'-CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA-3') и Bp2 (5'-AGA CTT AGT TGA TGC CCT AG-3'), амплифицирующих фрагмент 150 п.н., которые детектируют ВЭБ1 и ВЭБ2 соответственно.

Для дифференциальной детекции ВГЧ6А и ВГЧ6В применялся метод, описанный ранее [30, 35]. Одностадийную ПЦР проводили в одной пробирке, используя праймеры, специфичные к немедленно раннему гену (IEG) вируса: forward (CTC ATA AGG TGC TGA GTG ATC AGT T) и reverse (CCT CAG TGA CAG ATC TGG GC) [30]. В данном случае используется одна пара праймеров, которые в реакции амплификации дают два разных по размеру фрагмента — 206 и 431 п.н., соответствующих ВГЧ6А и ВГЧ6В.

Дифференциальный ПЦР-анализ проводили в отдельных пробирках (для ВЭБ1, ВЭБ2 и ВГЧ6А/В). Состав реакционной смеси общим объемом 25 мкл включал следующие реагенты: праймеры (5 пкмоль/в реакцию) (ДНК-синтез, Россия); 5-кратный ПЦР-буфер blue 15 mM  $Mg^{2+}$  (ЦНИИЭ, Россия); 2,5 е.а. Taq-F ДНК-полимеразу (ЦНИИЭ, Россия); смесь дезокси-нуклеозидтрифосфатов (до конечной концен-

трации 0,1 мМ) (Евроген, Россия); деионизированную воду I типа (Milli-Q Integral 3, Франция). В качестве матрицы использовали выделенную ДНК в объеме 5 мкл на реакцию (около 0,8 мкг). В данном исследовании для дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В нами применялся оптимизированный единый лабораторный протокол приготовления реакционной смеси и температурного профиля ПЦР-анализа. Условия для проведения амплификации в работе не приведены, так как оптимизированный вариант является объектом патентной защиты. Амплификацию специфичных фрагментов проводили на амплификаторе MaxuGene Gradient (Ахуген, США).

Продукты ПЦР-амплификации анализировались с помощью электрофореза в 3% агарозном геле, содержащем бромид этидия (0,02% по объему). В качестве стандарта для определения длины двухцепочечных молекул ДНК в интервале 100–1500 п.н. был использован маркер длин ДНК (100+ bp DNA Ladder) (Евроген, Россия). Результаты регистрировали на трансиллюминаторе InGenius 3 с использованием программного обеспечения GeneSys (Syngene, Великобритания). Полученные данные выражали в качественном формате — положительный или отрицательный.

## Результаты

### Количественное определение ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ6

На первом этапе исследования все пробы лейкоцитов периферической крови тестировались на наличие ДНК ВЭБ и ВГЧ6 методом количественной ПЦР-РВ. В результате среди

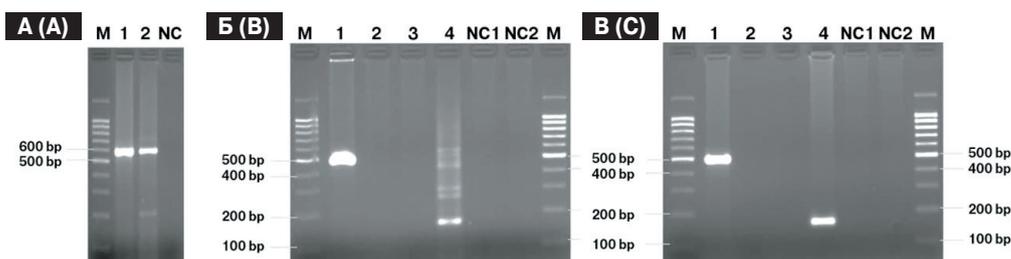
пациентов с ОИМ у 74% (37/50) обнаружена ДНК ВЭБ. По уровню вирусной нагрузки положительные пробы были объединены в две группы: с концентрацией ДНК ВЭБ < 1 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток и > 1 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток. В большинстве образцов — 81% (30/37) — содержание вирусной ДНК варьировало от 1,52 до 3,72 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток, при этом средняя концентрация составила 2,37 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток. В остальных случаях содержание вирусной ДНК не превышало 1 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток. Таким образом, ВЭБ-ассоциированный ОИМ подтверждался у 60% (30/50) из числа обследованных. ДНК ВГЧ6 выявлена в 66% (33/50) случаев ОИМ, но только в 3 пробах ее уровень незначительно превысил 1 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток (1,28–1,46 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток).

Образцы контрольной группы детей 1–15 лет были положительны на ДНК ВЭБ в 35% (10/29) случаев, на ДНК ВГЧ6 — в 74% (23/29) случаев. При этом у здоровых вирусоносителей концентрация ДНК ВЭБ и ВГЧ6 не превышала 1 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток практически во всех исследованных образцах. Исключением стали две девочки двух и пяти лет, у которых вирусная нагрузка ВЭБ составила 2,19 и 1,92 lgДНК/10<sup>5</sup> клеток на фоне отсутствия клинических симптомов.

### Дифференциальная детекция ВЭБ1 и ВЭБ2

На этапе генотипирования ВЭБ нами проведена оптимизация условий ПЦР-анализа, направленная на дифференциальную детекцию ВЭБ1 и ВЭБ2 не в двухраундовой («гнездовой») ПЦР, описанной в статьях [27, 31], а в однораундовой. Результаты работы представлены на рис. 1.

При использовании двухраундовой «гнездовой» ПЦР по результатам первого раунда



**Рисунок 1. Сравнение результатов двухраундового и однораундового вариантов ПЦР для детекции ВЭБ1 и ВЭБ2**

Figure 1. Comparing two-round vs. one-round PCR methods for detection of EBV1 and EBV2

**Примечание.** А) первый раунд «гнездовой» ПЦР: 1 — ВЭБ1(+) (596 п.н., проба 1), 2 — ВЭБ1(+) (596 п.н., проба 2); Б) второй раунд «гнездовой» ПЦР: 1 — ВЭБ1(+) (497 п.н., проба 1), 2 — ВЭБ2(-) (проба 1), 3 — ДНК ВЭБ1(-) (проба 2), 4 — ВЭБ2(+) (150 п.н., проба 2); В) оптимизированная однораундовая ПЦР: 1 — ВЭБ1(+) (497 п.н., проба 1), 2 — ВЭБ2(-) (проба 1), 3 — ДНК ВЭБ1(-) (проба 2), 4 — ВЭБ2(+) (150 п.н., проба 2). М — маркер длин фрагментов (bp = п.н.). NC, NC1, NC2 — отрицательный контроль.

Note. A) the first round of nested PCR: 1 — EBV (+) (596 bp, sample 1), 2 — EBV (+) (596 bp, sample 2); B) the second round of nested PCR: 1 — EBV1(+), 2 — EBV2 (-) (sample 1), 3 — EBV1 DNA (-) (sample 2), 4 — EBV2 (+) (150 bp, sample 2); C) optimized one-round PCR: 1 — EBV1 (+) (497 bp, sample 1), 2 — EBV2 (-) (sample 1), 3 — EBV1 DNA (-) (sample 2), 4 — EBV2 (+) (150 bp, sample 2). M — 100+ bp DNA ladder. NC, NC1, NC2 — negative control.

в ВЭБ-положительных образцах лейкоцитов периферической крови были амплифицированы фрагменты размером 596 п.н., одинаковые для обоих типов вируса (рис. 1А). Второй раунд ПЦР (детекция проводилась для каждой пробы в двух отдельных пробирках) позволил дифференцированно определить типы ВЭБ1 (497 п.н.) и ВЭБ2 (150 п.н.) (рис. 1Б). При этом для ВЭБ2 наблюдалось множество неспецифических фрагментов разных размеров. Оптимизированный нами вариант ПЦР, ориентированный на детекцию ВЭБ1 и ВЭБ2, отличался проведением амплификации в один раунд с использованием праймеров, приведенных в разделе «Материалы и методы» (исходно использовались во втором раунде ПЦР) (рис. 1В). Однораундовый вариант ПЦР характеризуется достаточной чувствительностью и специфичностью амплифицированных фрагментов.

В дальнейшем тестирование проб пациентов и контрольной группы проводилось с помощью оптимизированного метода. При обследовании пациентов с ОИМ во всех образцах был выявлен ВЭБ1. Единственная ВЭБ(+) проба (по результатам ПЦР-РВ) при типировании в однораундовой ПЦР показала отрицательный результат. При этом все результаты ВЭБ(–) проб были полностью конкордантны.

Обследование контрольной группы показало, что у здоровых вирусоносителей преобладающим типом также является ВЭБ1. Только один образец лейкоцитов крови, принадлежавший девочке в возрасте пяти лет, был положительным на ВЭБ2. Дискордантность результатов в образцах контрольной группы наблюдалась в каждой десятой пробе, в том числе ложноотрицательный результат был отмечен для ПЦР-РВ.

## Раздельная детекция ВГЧ6А и ВГЧ6В

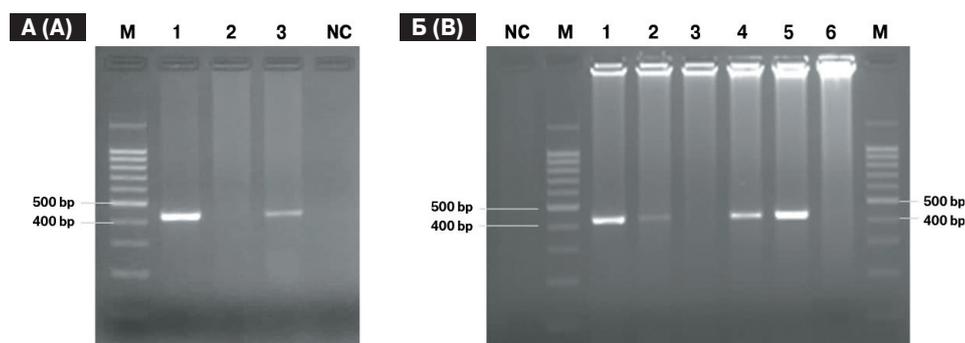
Определение ВГЧ6А и ВГЧ6В проводилось в ходе однораундовой ПЦР [30]. Среди пациентов с ОИМ выявлялся только ВГЧ6В. Дискордантность результатов увеличилась до каждой пятой пробы: 6 ВГЧ6(+) проб (по результатам ПЦР-РВ) прошли как отрицательные, а в 4 ВГЧ6(–) пробах, наоборот, обнаружен ВГЧ6В.

В контрольной группе также единственным выявленным видом стал ВГЧ6В. При исследовании материала в контрольной группе установлено 6 дискордантных проб, из которых ложноотрицательной в ПЦР-РВ была только одна.

## Оптимизация ПЦР для дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В

Проанализировав ситуацию с дискордантными пробами по результатам проведенного ПЦР-анализа, мы установили, что во всех случаях, в которых были получены отрицательные результаты, концентрация вирусной ДНК ВЭБ или ВГЧ6А/В находилась в диапазоне  $< 1 \text{ lgДНК}/10^5$  клеток. При этом значения концентрации, выражаемые в копиях ДНК в пробе, в данных образцах были менее 4,7. Следует отметить, что в других пробах пациентов и в контрольной группе при уровне ДНК менее 4,7 копий в пробе регистрировались и положительные результаты.

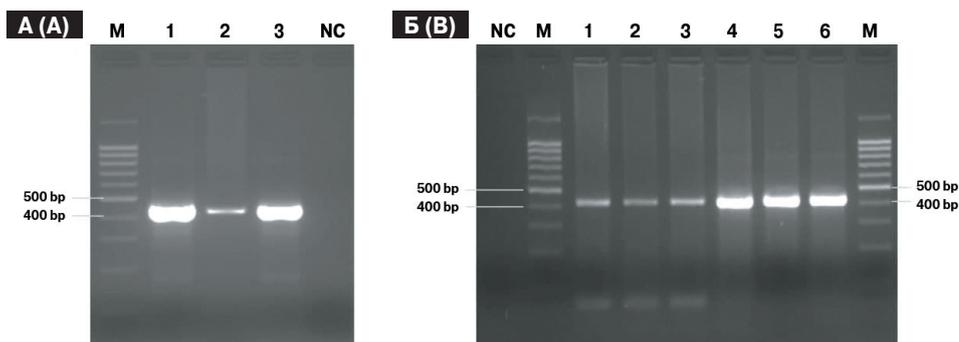
Так, при концентрации ВГЧ6В  $< 1 \text{ lgДНК}/10^5$  клеток отмечались выраженные различия в визуализации ПЦР-фрагментов в пробах с различным содержанием вирусной ДНК (рис. 2А). На рис. 2Б два образца с целевыми для нас концентрациями менее 4,7 копий в пробе представлены в триплетах. Данные свидетельствуют о низкой сходности результатов исследований при установленных



**Рисунок 2. Результаты дифференциальной детекции ВГЧ6А и ВГЧ6В в образцах с низкой вирусной нагрузкой ( $< 1 \text{ lgДНК}/10^5$  клеток)**

Figure 2. Results of differentially detected HHV6A and HHV6B in samples with low viral load ( $< 1 \text{ lgДНК}/10^5$  cells)

**Примечание.** А) детекция ВГЧ6В (431 п.н.) при концентрации ДНК 15,0 копий в пробе (линия 1), 0,4 копии в пробе (линия 2), 4,0 копии в пробе (линия 3); Б) детекция ВГЧ6В (431 п.н.) в триплетах при концентрации ДНК 0,4 копии в пробе (линии 1, 2, 3), 4,0 копии в пробе (линии 4, 5, 6). М — маркер длин фрагментов (bp = п.н.). NC — отрицательный контроль.  
Note. А) HHV6B (431 bp) detection: 15.0 DNA copies per probe (lane 1), 0.4 DNA copies per probe (lane 2), 4.0 DNA copies per probe (lane 3); В) HHV6B (431 bp) in triplets at concentration of 0.4 DNA copies per probe (lanes 1, 2, 3), 4.0 DNA copies per probe (lanes 4, 5, 6). М — 100+ bp DNA ladder. NC — negative control.



**Рисунок 3. Результаты оптимизации ПЦР-анализа для проб с низкой вирусной нагрузкой (< 1 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток)**

Figure 3. Results of PCR optimization analysis for samples with low viral load (< 1 IgDNA/10<sup>5</sup> cells)

**Примечание.** А) реамплификация ВГЧ6В (431 п.н.) при концентрации ДНК 15,0 копий в пробе (линия 1), 0,4 копии в пробе (линия 2), 4,0 копии в пробе (линия 3); Б) однораундовая ПЦР (в триплетах) после концентрирования проб: исходно 0,4 копии в пробе (линии 1, 2, 3), 4,0 копии в пробе (линии 4, 5, 6). М — маркер длин фрагментов (bp = п.н.). NC — отрицательный контроль.

Note. A) reamplification of HHV6B (431 bp) at concentration of 15.0 DNA copies per probe (lane 1), 0.4 DNA copies per probe (lane 2), 4.0 DNA copies per probe (lane 3); B) one-round PCR (in triplets) after DNA enrichment in samples: initially 0.4 DNA copies per probe (lanes 1, 2, 3), 4.0 DNA copies per probe (lanes 4, 5, 6). M — 100+ bp DNA ladder. NC — negative control.

предельных значениях чувствительности применяемых методов. Таким образом, обнаружение вирусной ДНК в этих образцах во многом может носить случайный характер.

На следующем этапе для проб с вирусной нагрузкой < 1 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток работа проводилась по двум направлениям: а) проведение второго раунда ПЦР с теми же праймерами, которые использовались в однораундовой ПЦР (реамплификация); б) концентрирование ДНК в пробах (рис. 3).

Реамплификация, когда во втором раунде ПЦР используется матрица и праймеры, фигурирующие в первом раунде ПЦР, позволяет повысить эффективность детекции (рис. 3А). Например, при определении ВГЧ6А/ВГЧ6В с помощью такого способа дополнительно были выявлены положительные образцы еще у 6% пациентов с ОИМ, составившие суммарно 72%, и все они были ВГЧ6В(+). Концентрирование проб путем добавления ацетата натрия (рН 7,0) и изопропанола в большинстве низкокопийных проб позволяет достичь стабильной воспроизводимости результатов в триплетах (рис. 3Б) и повысить концентрацию как тотальной, так и вирусной ДНК до детектируемого с помощью электрофореза уровня (табл.). Следует отметить, что ни в одной из исследуемых проб, в том числе после оптимизации, ВГЧ6А обнаружен не был.

## Обсуждение

ВЭБ и ВГЧ6А/В отличаются выраженной лимфотропностью, поражая преимущественно В- и Т-клетки соответственно. В латентном периоде инфекции основным резервуаром обоих вирусов остаются главным образом мононук-

леарные клетки периферической крови [21, 26]. Эффективность обнаружения патогенов во многом определяется выбором исследуемого клинического материала. Именно поэтому в нашей работе основным материалом послужили лейкоциты периферической крови. По данным литературы, результаты детекции ВЭБ и ВГЧ6 могут существенно различаться. Так, частота выявления ДНК ВЭБ в мононуклеарных клетках периферической крови при ОИМ варьирует у разных авторов от 30,3 [28] до 100% [21]. Исследования здоровых вирусоносителей в детской популяции проводятся, как правило, на малочисленных выборках. У взрослых такое ограничение отсутствует. При этом данные довольно сильно разнятся. Так, у взрослых доноров крови ДНК ВЭБ обнаруживается, по одним сведениям, в 5,1% случаев, ДНК ВГЧ6 — в 6,1% [32], по другим — в 72 и 30% соответственно [24]. Высокая степень расхождения данных, вероятнее всего, обусловлена отсутствием стандартизации лабораторных методов, применяемых разными группами исследователей, в том числе на этапе выбора праймеров к разным генам вирусов. Объективные трудности может создавать низкое содержание нуклеиновой кислоты определенного патогена в исследуемом материале. Известно, что в латентной фазе, характерной для здоровых вирусоносителей, в периферической крови ВЭБ персистирует в 1–50 инфицированных клетках на миллион В-клеток [16].

В соответствии с результатами наших исследований частота выявления ДНК ВЭБ и ВГЧ6 в лейкоцитах периферической крови при ОИМ у детей 1–15 лет составила 74 и 72%, а в контрольной группе — 35 и 74% соответственно. При этом вирусная нагрузка распределилась следующим

**Таблица. Результаты концентрирования проб с низким содержанием ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ6 (< 1 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток)**Table. DNA sample enrichment for low EBV DNA and HHV6 DNA cases (< 1 IgDNA/10<sup>5</sup> cells)

№ образца Sample ID	ДНК общая, мкг/мл DNA total, µg/µl		ДНК ВЭБ, копий в пробе EBV DNA, copies per probe		ДНК ВГЧ6, копий в пробе HHV6 DNA, copies per probe	
	до before	после after	до before	после after	до before	после after
1315	0,123	0,458	0	1,90	1,47	8,80
1358	0,210	0,598	0,59	7,81	0,44	2,30
1390	0,167	0,438	7,47	13,59	3,28	13,34
1393	0,125	0,460	0,54	2,16	1,20	6,68
1173	0,240	0,730	0	0	0	0,96
1185	0,152	0,705	4,70	36,3	0	0,43
Отрицательный контроль Negative control	0,175	0,603	0	0	0	0
Положительный контроль Positive control	0,462	0,570	830	2400	2,41	21,30

**Примечание.** Отрицательный контроль — серонегативный образец крови, ДНК ВЭБ(-) и ВГЧ6(-); положительный контроль — серопозитивный пациент, ДНК ВЭБ — 3,72 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток, ДНК ВГЧ6 — 1,46 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток. Серые ячейки — положительные результаты при детекции на электрофорезе.

Note. Negative control — seronegative blood sample, EBV DNA(-) and HHV6 DNA(-); positive sample — seropositive sample, EBV DNA — 3.72 IgDNA/10<sup>5</sup> cells, HHV6 DNA — 1.46 IgDNA/10<sup>5</sup> cells. Gray boxes depict positive results after running electrophoresis.

образом: в группе пациентов с ОИМ значения концентрации ДНК ВЭБ > 1 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток выявлялись у 81% (30/37), средняя концентрация составила 2,37 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток, в остальных случаях содержание вирусной ДНК не превышало 1 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток. Таким образом, ВЭБ-ассоциированный ОИМ подтверждался в отношении 60% (30/50) обследованных пациентов. У здоровых вирусоносителей концентрация ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ6 не превышала 1 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток практически во всех исследованных образцах. Исключением являются две девочки двух и пяти лет, у которых вирусная нагрузка ВЭБ составила 1,92 и 2,19 IgДНК/10<sup>5</sup> клеток на фоне отсутствия клинических симптомов. Следует отметить, что сравнение результатов количественной ПЦР, представленных в разных публикациях, вызывает определенные затруднения из-за отсутствия стандартизации единиц измерения (копии на микрограмм ДНК, копии на миллилитр, копии на 100 000 лейкоцитов, логарифм копий ДНК на 100 000 клеток, копии на инфицированную клетку).

Рутинным методом лабораторной диагностики ВЭБ- и ВГЧ6-инфекции остается серологический, не позволяющий оценить гетерогенность циркулирующей популяции каждого вируса. В основе существующих лабораторных технологий для изучения генетического разнообразия патогенов лежит метод ПЦР [12]. Для дифференциальной детекции основных типов ВЭБ и разных видов ВГЧ6 исследователи применяют отличающиеся лабораторные протоколы преимущественно на основе качественной «гнездовой» ПЦР [22, 31]. Отдельного внимания при этом требуют методические подходы для обогащения

вирусного генетического материала в образцах с низким содержанием нуклеиновых кислот извлекаемых патогенов [12].

Оптимизированный в данной работе методический подход позволяет отдельно детектировать основные типы ВЭБ, а также виды ВГЧ6 по единому лабораторному протоколу, а с дополнительным этапом концентрирования ДНК повышает диагностическую чувствительность ПЦР-анализа, минимизирует долю дискордантных и ложноотрицательных результатов.

Основной классификацией является деление ВЭБ на два типа — ВЭБ1 и ВЭБ2 [18]. С 2012 г. ВГЧ6А и ВГЧ6В ратифицированы как отдельные виды [14, 15]. Их географическое распределение имеет определенные особенности. Оба типа ВЭБ встречаются повсеместно, однако ВЭБ1 является основным типом, распространенным во всем мире. Он доминирует среди населения Европы, Северной Америки, Азии. В то же время ВЭБ2 считается характерным типом вируса, циркулирующим в регионе Африки к югу от Сахары и в Папуа — Новой Гвинее [33, 36]. ВГЧ6В является основной причиной первичной ВГЧ6-инфекции в США, Великобритании, Японии и России, а ВГЧ6А чаще обнаруживается в африканских странах [6].

В настоящее время имеется мало доказательств обусловленности заболеваний определенным типом ВЭБ. Так, в одной из работ показано, что инфекционный мононуклеоз чаще ассоциировался с типом ВЭБ1, нежели с типом ВЭБ2. В другом исследовании существенных различий выявлено не было. Предполагается, что инфицирование ВЭБ2 может происходить в условиях хронической иммунной активации, например

в тех частях Африки, где много сопутствующих инфекций, включая малярию, или у иммунокомпрометированных лиц [33]. ВГЧ6В является основным этиологическим агентом первичной ВГЧ6-инфекции у детей раннего возраста. ВГЧ6А регистрируется в более старшем возрасте и отличается большей нейротропностью. Оба вируса способны интегрироваться в хромосомы человека и передаваться по наследству [6].

Полученные нами результаты свидетельствуют о преобладании в вирусной популяции среди обследованных детей Нижегородского региона ВЭБ1 и ВГЧ6В, что согласуется с существующими представлениями об их географическом распределении на прилегающих территориях. Следует отметить, что ВЭБ2 был обнаружен только в одной пробе контрольной группы детей. ВГЧ6А не детектировался ни в одной из исследуемых групп.

Для клинико-эпидемиологической характеристики ВГЧ6А, ВГЧ6В, а также типов ВЭБ1/ВЭБ2 требуются дальнейшие, более масштабные исследования.

## Заключение

В контексте метода ПЦР оптимизированы методические подходы для дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В, что впервые позволило на более детальном уровне оценить циркуляцию данных вирусов на территории Нижегородского региона.

Оптимизация раздельной детекции основных типов ВЭБ, а также видов ВГЧ6 базировалась на использовании комплексного подхода, включающего применение однораундового варианта ПЦР вместо двухраундового, а также

единого лабораторного протокола исследования для разных вирусов, что существенно упрощает диагностический процесс. Другой аспект оптимизации направлен на концентрирование вирусной ДНК в образцах лейкоцитов периферической крови, характеризующихся низкой вирусной нагрузкой, что позволяет повысить чувствительность анализа и снизить долю ложноотрицательных результатов.

Среди пациентов с ОИМ и в контрольной группе установлено преобладание ВЭБ1 и ВГЧ6В. При этом ВГЧ6А не детектировался ни в одном из исследованных образцов, а ВЭБ2 был обнаружен только в одном случае в лейкоцитах крови волонтера из контрольной группы.

По результатам проведенного исследования предлагается следующий алгоритм дифференциальной диагностики основных типов ВЭБ и видов ВГЧ6. На первом этапе тестирования могут применяться стандартизованные коммерческие наборы для количественного определения ДНК ВЭБ и ВГЧ6 в клиническом материале с последующим распределением образцов в зависимости от вирусной нагрузки:  $> 1 \text{ lgДНК}/10^5$  клеток или  $< 1 \text{ lgДНК}/10^5$  клеток. На втором этапе пробы, содержащие  $> 1 \text{ lgДНК}/10^5$  клеток, сразу могут тестироваться с применением оптимизированного нами варианта однораундовой ПЦР. Пробы с содержанием  $< 1 \text{ lgДНК}/10^5$  клеток перед ПЦР-анализом рекомендуется дополнительно обработать ацетатом натрия (рН 7,0) и изопропанолом для концентрирования ДНК, а затем провести анализ с помощью оптимизированной однораундовой ПЦР. Данный методический подход может применяться в диагностических, эпидемиологических и научно-исследовательских целях.

## Список литературы/References

1. Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена LMP1 у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, № 2. С. 11–17. [Goncharova E.V., Senyuta N.B., Smirnova K.V., Shcherbak L.N., Gurtsevich V.E. Epstein–Barr virus (EBV) in Russia: infection of the population and analysis of the LMP1 gene variants in patients with EBV-associated pathologies and healthy individuals. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2015, vol. 60, no. 2, pp. 11–17. (In Russ.)]
2. Гурцевич В.Э., Смирнова К.В., Ботезату И.В., Душенькина Т.Е., Лубенская А.К., Дубар Э., Сенюта Н.Б., Лихтенштейн А.В., Петров С.В. Полиморфизм онкогена LMP1 вируса Эпштейна–Барр в двух этнических группах России, татар и славян, и его влияние на развитие некоторых злокачественных опухолей // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 347–358. [Gurtsevich V.E., Smirnova K.V., Botezatu I.V., Dushenkina T.E., Lubenskaya A.K., Dubar E., Senyuta N.B., Lichtenstein A.V., Petrov S.V. Epstein–Barr virus LMP1 oncogene polymorphism in tatar and slavic populations in Russian Federation impacting on some malignant tumours. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 347–358. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-EBV-1162
3. Львов Н.Д., Дудукина Е.А. Ключевые вопросы диагностики Эпштейна–Барр вирусной инфекции // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2013. № 3. С. 24–32. [Lvov N.D., Dudukina E.A. Key issues of current and diagnosis of Epstein–Barr virus infection. *Infektsionnye bolezni: novosti, mnenia, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2013, no. 3, pp. 24–32. (In Russ.)]
4. Мелехина Е.В., Домонова Э.А., Гоптарь И.А., Шипулина О.Ю., Горелов А.В. Первый в России случай наследственной передачи хромосомно-интегрированного вируса герпеса человека 6В (Human betaherpesvirus 6В) // Вопросы практической педиатрии. 2019. Т. 14, № 1. С. 33–40. [Melekhina E.V., Domonova E.A., Goptar I.A., Shipulina O.Yu., Gorelov A.V. First verified case of hereditary transmission of chromosomally integrated Human betaherpesvirus 6B. *Voprosy prakticheskoy pediatrii = Clinical Practice in Pediatrics*, 2019, vol. 14, no. 1, pp. 33–40. (In Russ.)] doi: 10.20953/1817-7646-2019-1-33-40

5. Мелехина Е.В., Музыка А.Д., Калугина М.Ю., Горелов А.В., Чугунова О.Л. Современные представления об инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6 типа // Архив внутренней медицины. 2016. Т. 6, № 1. С. 13–19. [Melekhina E.V., Muzyka A.D., Kalugina M.J., Gorelov A.V., Chugunova O.L. Current concept of human herpesvirus type 6 infection. *Arkhiv vnutrenney meditsiny = The Russian Archives of Internal Medicine*, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 13–19. (In Russ.)] doi: 10.20514/2226-6704-2016-6-1-13-19
6. Никольский М.А., Вязовая А.А., Ведерников В.Е., Нарвская О.В., Лиознов Д.А., Смирнова Н.Н., Полунина А.В., Бурмистрова А.Г., Золотова М.А. Молекулярно-биологическая характеристика вируса герпеса человека 6-го типа у пациентов с различными вариантами течения заболевания // Педиатрия. 2019. Т. 98, № 1. С. 53–56. [Nikolsky M.A., Vyazovaya A.A., Vedernikov V.E., Narvskaya O.V., Lioznov D.A., Smirnova N.N., Polunina A.V., Burmistrova A.G., Zolotova M.A. Molecular and biological characteristics of human herpes virus type 6 in patients with different variants of the disease course. *Pediatr = Pediatrics*, 2019, vol. 98, no. 1, pp. 53–56. (In Russ.)] doi: 10.24110/0031-403X-2019-98-1-53-56
7. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: государственный доклад. М.: Роспотребнадзор, 2019. 254 с. [On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2018: state report. *Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing*, 2019. 254 p. (In Russ.)]
8. Смирнова К.В., Дидук С.В., Гурцевич В.Э. Полиморфизм онкогена LMP1 вируса Эпштейна–Барр у представителей коренного малочисленного народа Дальнего Востока России // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017. Т. 22, № 5. С. 239–247. [Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevich V.E. Polymorphism of Epstein–Barr virus LMP1 oncogene in nanaians, representatives of indigenous minority of the Russian Far East. *Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni = Epidemiology and infectious diseases*, 2017, vol. 22, no. 5, pp. 239–247. (In Russ.)] doi: 10.18821/1560-9529-2017-22-5-239-247
9. Соломай Т.В. Динамика заболеваемости и территориальное распространение инфекционного мононуклеоза // Здравоохранение Российской Федерации. 2019. Т. 63, № 4. С. 186–192. [Solomay T.V. Dynamics of morbidity and territorial spread of infectious mononucleosis. *Zdravookhranenie Rossiiskoi Federatsii = Health Care of the Russian Federation, Russian Journal*, 2019, vol. 63, no. 4, pp. 186–192. (In Russ.)] doi: 10.18821/0044-197X-2019-63-4-186-192
10. Тимченко В.Н., Баннова С.Л., Павлова Н.В., Павлова Е.Б., Каплина Т.А., Федорова А.В., Булина О.В., Балашов А.Л., Хакизimana Ж.-К. ВЭБ-мононуклеоз на госпитальном этапе: клиническая характеристика и этиотропная терапия у детей различного возраста // Педиатр. 2018. Т. 9, № 6. С. 77–82. [Timchenko V.N., Bannova S.L., Pavlova N.V., Pavlova E.B., Kaplina T.A., Fedorova A.V., Bulina O.V., Balashov A.L., Hakizimana J.-C. EBV-mononucleosis in children at the hospital stage in modern conditions. *Pediatr = Pediatrician*, 2018, vol. 9, no. 6, pp. 77–82. (In Russ.)]
11. Хакизimana Ж.К., Тимченко В.Н., Шакмаева М.А., Каплина Т.А., Субботина М.Д., Баннова С.Л., Федорова А.В., Суховецкая В.Ф., Павлова Е.Б., Павлов Н.В. ВЭБ-мононуклеоз у детей в современных условиях // Детские инфекции. 2020. Т. 19, № 2. С. 23–28. [Hakizimana J.K., Timchenko V.N., Shakmaeva M.A., Kaplina T.A., Subbotina M.D., Bannova S.L., Fedorova A.V., Sukhovetskaya V.F., Pavlova E.B., Pavlova N.V. EBV mononucleosis in children in modern conditions. *Detskie infektsii = Children's Infections*, 2020, vol. 19, no. 2, pp. 23–28. (In Russ.)] doi: 10.22627/2072-8107-2020-19-2-23-28
12. Хафизов К.Ф., Сперанская А.С., Мацвай А.Д., Шипулин Г.А., Дедков В.Г. Передовые технологии в диагностике вирусных заболеваний неясной этиологии // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 9–25. [Khafizov K.F., Speranskaya A.S., Matsvay A.D., Shipulin G.A., Dedkov V.G. Advanced technologies in diagnostics of viral diseases of unknown etiology. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 9–25. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ATI-824
13. Шарипова Е.В., Бабаченко И.В. Герпесвирусные инфекции и инфекционный мононуклеоз (обзор литературы) // Журнал инфектологии. 2013. Т. 5, № 2. С. 5–12. [Sharipova E.V., Babachenko I.V. Herpesvirus infection and infectious mononucleosis. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2013, vol. 5, no. 2, pp. 5–12. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2013-5-2-
14. Ablashi D., Agut H., Alvarez-Lafuente R., Clark D.A., Dewhurst S., DiLuca D., Flamand L., Frenkel N., Gallo R., Gompels U.A., Höllsberg P., Jacobson S., Luppi M., Lusso P., Malnati M., Medveczky P., Mori Y., Pellett P.E., Pritchett J.C., Yamanishi K., Yoshikawa T. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch. Virol.*, 2014, vol. 159, pp. 863–870. doi: 10.1007/s00705-013-1902-5
15. Adams M.J., Carstens E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.*, 2012, vol. 157, no. 7, pp. 1411–1422. doi: 10.1007/s00705-012-1299-6
16. Babcock G.J., Decker L.L., Volk M., Thorley-Lawson D.A. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*, 1998, vol. 9, no. 3, pp. 395–404. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80622-6
17. Bhatia K., Raj A., Guitierrez M.I., Judde J.G., Spangler G., Venkatesh H., Magrath I.T. Variation in the sequence of Epstein–Barr virus nuclear antigen 1 in normal peripheral blood lymphocytes and in Burkitt's lymphomas. *Oncogene*, 1996, vol. 13, pp. 177–181.
18. Dambaugh T., Hennessy K., Chamnankit L., Kieff E. U2 region of Epstein–Barr virus DNA may encode Epstein–Barr nuclear antigen 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, pp. 7632–7636. doi: 10.1073/pnas.81.23.7632
19. Edwards R.H., Seillier-Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein–Barr virus strains. *Virology*, 1999, vol. 261, pp. 79–95. doi: 10.1006/viro.1999.9855
20. Eliassen E., Lum E., Pritchett J., Ongradi J., Krueger G., Crawford J.R., Phan T.L., Ablashi D., Hudnall S.D. Human Herpesvirus 6 and malignancy: a review. *Front. Oncol.*, 2018, vol. 8: 512. doi: 10.3389/fonc.2018.00512
21. Fafi-Kremer S., Brengel-Pesce K., Barguès G., Bourgeat M.J., Genoulaz O., Seigneurin J.M., Morand P. Assessment of automated DNA extraction coupled with real-time PCR for measuring Epstein–Barr virus load in whole blood, peripheral mononuclear cells and plasma. *J. Clin. Virol.*, 2004, vol. 30, no. 2, pp. 157–164. doi: 10.1016/j.jcv.2003.10.002
22. Greninger A.L., Roychoudhury P., Makhous N., Hanson D., Chase J., Krueger G., Xie H., Huang M.-L., Saunders L., Ablashi D., Koelle D.M., Cook L., Jerome K.R. Copy number heterogeneity, large origin tandem repeats, and interspecies recombination in human herpesvirus 6A (HHV-6A) and HHV-6B reference strains. *J. Virol.*, 2018, vol. 92, no. 10: e00135-18. doi: 10.1128/JVI.00135-18
23. Hu L.F., Zabarovsky E.R., Chen F., Cao S.L., Ernberg I. Isolation and sequencing of the Epstein–Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J. Gen. Virol.*, 1991, vol. 72, pp. 2399–2409. doi: 10.1099/0022-1317-72-10-2399

24. Hudnall S.D., Chen T., Allison P., Tyring S.K., Heath A. Herpesvirus prevalence and viral load in healthy blood donors by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Transfusion*, 2008, vol. 48, no. 6, pp. 1180–1187. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01685.x
25. Kanda T., Yajima M., Ikuta K. Epstein–Barr virus strain variation and cancer. *Cancer Sci.*, 2019, vol. 110, no. 4, pp. 1132–1139. doi: 10.1111/cas.13954
26. Kondo K., Kondo T., Okuno T., Takahashi M., Yamanishi K. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J. Gen. Virol.*, 1991, vol. 72, no. 6, pp. 1401–1408. doi: 10.1099/0022-1317-72-6-1401
27. Mendes T.M., Oliveira L.C., Yamamoto L., Del Negro G.M., Okay T.S. Epstein–Barr virus nuclear antigen-2 detection and typing in immunocompromised children correlated with lymphoproliferative disorder biopsy findings. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2008, vol. 12, no. 3, pp. 186–191. doi: 10.1590/s1413-86702008000300005
28. Monteiro T.A.F., Costa I.B., Costa I.B., Corrêa T.L.D.S., Coelho B.M.R., Silva A.E.S., Ramos F.L.P., Filh A.J.M., Monteiro J.L.F., Siqueira J.A.M., Gabbay Y.B., Sousa R.C.M. Genotypes of Epstein–Barr virus (EBV1/EBV2) in individuals with infectious mononucleosis in the metropolitan area of Belém, Brazil, between 2005 and 2016. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 24, no. 4, pp. 322–329. doi: 10.1016/j.bjid.2020.06.004
29. Packham G., Brimmell M., Cook D., Sinclair A.J., Farrell P.J. Strain variation in Epstein–Barr virus immediate early genes. *Virology*, 1993, vol. 192, no. 2, pp. 541–550. doi: 10.1006/viro.1993.1070
30. Reddy S., Manna P. Quantitative detection and differentiation of human herpesvirus 6 subtypes in bone marrow transplant patients by using a single real-time polymerase chain reaction assay. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2005, vol. 11, pp. 530–541. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.04.010
31. Smatti M.K., Yassine H.M., Abu Odeh R., Al Marawani A., Taleb S.A., Althani A.A., Nasrallah G.K. Prevalence and molecular profiling of Epstein–Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 12: e0189033. doi: 10.1371/journal.pone.0189033
32. Traore L., Tao I., Bisseye C., Diarra B., Compaore T.R., Nebie Y., Assih M., Ouedraogo A., Zohoncon T., Djigma F., Ouermi D., Barro N., Sanou M., Ouedraogo R.T., Simpore J. Molecular diagnosis of cytomegalovirus, Epstein–Barr virus and herpes virus 6 among blood donors in Ouagadougou, Burkina Faso. *BMC Infectious Diseases*, 2014, vol. 14, no. 2: P99. doi: 10.1186/1471-2334-14-s2-p99
33. Tzellos S., Farrell P.J. Epstein–Barr virus sequence variation–biology and disease. *Pathogens*, 2012, vol. 1, no. 2, pp. 156–174. doi: 10.3390/pathogens1020156
34. Walling D.M., Shebib N., Weaver S.C., Nichols C.M., Flaitz C.M., Webster-Cyriaque J. The molecular epidemiology and evolution of Epstein–Barr virus: Sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J. Infect. Dis.*, 1999, vol. 179, pp. 763–774. doi: 10.1086/314672
35. Yalcin S., Karpuzglu T., Suleymanlar G., Mutlu G., Mukai T., Yamamoto T., Isegawa Y., Yamanishi K. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections in renal transplant recipients and healthy adults in Turkey. *Arch. Virol.*, 1994, vol. 136, pp. 183–190. doi: 10.1007/BF01538827
36. Zimmer U., Adldinger H.K., Lenoir G.M., Vuillaume M., Knebel-Doerberitz M.V., Laux G., Desgranges C., Wittmann P., Freese U.K., Schneider U., Bornkamm G.W. Geographical prevalence of two types of Epstein–Barr virus. *Virology*, 1986, vol. 154, pp. 56–66. doi: 10.1016/0042-6822(86)90429-0

**Авторы:**

**Попкова М.И.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

**Уткин О.В.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

**Соболева Е.А.**, врач-инфекционист, ассистент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия;

**Сахарнов Н.А.**, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

**Брызгалова Д.А.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

**Сенатская А.О.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

**Кулова Е.А.**, к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней, ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия.

**Authors:**

**Popkova M.I.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Utkin O.V.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Soboleva E.A.**, Infectologist, Assistant Professor, Department of Infectious Diseases, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Sakharnov N.A.**, Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Bryzgalova D.A.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Senatskaia A.O.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Kulova E.A.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Infectious Diseases, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

# УРОВЕНЬ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ В НЕЙРОАМИНСОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУРАХ ЛЕГКИХ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ТУБЕРКУЛЕЗА

Н.Е. Гималдинова<sup>1</sup>, Л.А. Любовцева<sup>1</sup>, Е.В. Любовцева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия

<sup>2</sup> Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы Минздрава Чувашии, г. Чебоксары, Россия

**Резюме.** Цель исследования — выявить особенности вариаций локализации моноаминов (катехоламинов, серотонина) в клеточных структурах аутопсийного материала легких, пораженных туберкулезным процессом. *Материалы и методы.* Исследовано 165 случаев вторичного туберкулеза легких. Изучено 2500 гистологических препаратов пациентов в возрасте от 30 до 55 лет, разделенных на 5 групп соответственно формам туберкулеза. Для определения содержания нейротрансмиттеров в структурах легких применялся люминесцентно-гистохимический метод Фалька–Хилларпа. *Результаты.* При применении люминесцентно-гистохимического метода Фалька–Хилларпа в аутопсийном материале легких, пораженных специфическим воспалительным процессом, были обнаружены микобактерии туберкулеза, содержащие катехоламины и серотонин, а также выявлялись нейроаминсодержащие гранулярные люминесцирующие клетки и тучные клетки. Пораженные и непораженные участки легких содержат разное количество моноаминов. Число клеток и содержание изучаемых биоаминов зависит от формы вторичного туберкулеза. Установлено, что при малых формах вторичного туберкулеза (острый очаговый, фиброзно-очаговый, инфильтративный) изменяется число клеток и количественные показатели изучаемых нейротрансмиттеров (катехоламинов, серотонина) в гранулярных люминесцирующих клетках и тучных клетках в сторону увеличения. При деструктивных процессах в легких показатели содержания катехоламинов в исследуемых структурах в зоне поражения преобладают над показателями контроля. Концентрация серотонина в изучаемых клетках пораженного туберкулезным процессом участка ткани легкого снижена. Эластические нервные волокна в местах поражения микобактериями также были изменены. Они не имели четкости люминесценции, выглядели «оплывшими», местами в них отсутствовали варикозные расширения. *Заключение.* Сопоставив результаты проведенного исследования с литературными данными, мы установили, что туберкулезное поражение легких протекает как реакция замедленного типа, а микобактерия туберкулеза проявляет себя как корпускулярный антиген.

**Ключевые слова:** гранулярные люминесцирующие клетки, катехоламины, серотонин, тучные клетки, вегетативная нервная система, туберкулез, APUD-система.

---

**Адрес для переписки:**

Гималдинова Наталья Евгеньевна  
428031, Россия, г. Чебоксары, Московский пр., 15,  
ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет  
имени И.Н. Ульянова.  
Тел.: 8 927 852-34-16.  
E-mail: ngimaldinova@yandex.ru

**Contacts:**

Natalia E. Gimaldinova  
428031, Russian Federation, Cheboksary, Moskovsky pr., 15,  
Chuvash State University named after I.N. Ulyanov.  
Phone: +7 927 852-34-16.  
E-mail: ngimaldinova@yandex.ru

**Для цитирования:**

Гималдинова Н.Е., Любовцева Л.А., Любовцева Е.В. Уровень нейротрансмиттеров в нейроаминсодержащих структурах легких при разных формах туберкулеза // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1067–1074. doi: 10.15789/2220-7619-DON-1632

**Citation:**

Gimaldinova N.E., Lybovtseva L.A., Lybovtseva E.V. Neurotransmitter level in neuroamin-containing lung structures in different forms of tuberculosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1067–1074. doi: 10.15789/2220-7619-DON-1632

## NEUROTRANSMITTER LEVEL IN NEUROAMIN-CONTAINING LUNG STRUCTURES IN DIFFERENT FORMS OF TUBERCULOSIS

Gimaldinova N.E.<sup>a</sup>, Lybovtseva L.A.<sup>a</sup>, Lybovtseva E.V.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary, Russian Federation

<sup>b</sup> Republican Bureau of Forensic Medical Examination of the Ministry of Health of Chuvashia, Cheboksary, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the study was to identify features of varying localization of monoamines (catecholamines, serotonin) in the cell structures in tuberculosis-affected lung autopsy samples. *Material and methods.* 165 cases of secondary pulmonary tuberculosis were studied by examining 2,500 histological preparations from patients aged 30 to 55 years, divided into 5 groups, corresponding to the forms of tuberculosis. The Falck–Hillarp luminescence-histochemical method was used to determine the content of neurotransmitters in lung structures. *Results.* While using the Falck–Hillarp luminescence-histochemical method, mycobacteria tuberculosis containing catecholamines and serotonin were detected in autopsy material of lungs affected by a specific inflammatory process, as well as neuroamine-containing granular luminescent cells and mast cells. Affected and intact areas of the lungs contain different amounts of monoamines. The number of cells and level of the bioamines studied depends on the form of secondary tuberculosis. It was found that in small forms of secondary tuberculosis (acute focal, fibrous-focal, infiltrative), the number of cells and quantitative parameters of neurotransmitters (catecholamines, serotonin) examined in granular luminescent and mast cells change to rise. In case of lung destructive processes, the level of catecholamines in the structures studied of affected area was higher than in control. The concentration of serotonin in the studied cells lung tissue affected by the tuberculosis process was reduced. Elastic nerve fibers at the sites of mycobacteria were altered as well. They displayed no clear luminescence, looked “swollen”, sometimes lacking varicose veins. *Conclusion.* Comparing the results of the study with the literature data, it was found that pulmonary tuberculosis occurs as a delayed reaction, and *Mycobacterium tuberculosis* manifests itself as a corpuscular antigen.

**Key words:** granular luminescent cells, catecholamines, serotonin, fat cells, autonomic nervous system, tuberculosis, APUD system.

## Введение

В настоящее время одной из актуальных проблем медицины является изучение механизмов специфического воспалительного ответа при проникновении микобактерии туберкулеза в ткани легких. Варианты течения, эффективность лечения и прогнозы этого заболевания напрямую связаны с состоянием иммунной системы организма. Известно, что в практике для выявления микобактерий используют люминесцентный краситель аурумин. Применение люминесцентно-гистохимических методов позволяет как в легких, так и во многих органах иммунной защиты выявить также клетки — продуценты нейроаминов: тучные клетки (ТК) и гранулярные люминесцирующие клетки (ГЛК) (аминоциты: моноаминоциты и диаминоциты) [3, 7, 8]. Воздействие окружающей среды приводит к активации внутренних механизмов обмена веществ в легких посредством нейротрансмиттеров [2]. Клеточные структуры легких тесно взаимосвязаны между собой и регулируются гуморальным нейромедиаторным звеном ВНС и взаимодействиями нейромедиаторов между собой [5, 7, 9].

Известно, что биологически активные вещества, такие как нейроамины (нейротрансмиттеры), способны регулировать на местном уровне многие процессы, осуществляющиеся в отдельно взятом органе [4, 6]. В связи с этим целью данного исследования является выявление особенностей вариаций локализации моноаминов

(катехоламинов — КА, серотонина — СТ) в клеточных структурах аутопсийного материала легких, пораженных туберкулезным процессом.

## Материалы и методы

Наше исследование проводилось на аутопсийном материале, взятом в Бюро судебно-медицинской экспертизы г. Чебоксары от больных туберкулезом в первые 6 часов с момента наступления биологической смерти. При этом был проведен тщательный отбор больных, у которых (по данным медицинской документации [история болезни, амбулаторная карта, карта диспансерного наблюдения]) ранее диагностированы и подтверждены клинико-лабораторными, биохимическими, бактериологическими, рентгенологическими методами разные формы вторичного туберкулеза. Нами было исследовано 165 случаев вторичного туберкулеза легких. Изучено 2500 гистологических препаратов пациентов в возрасте от 30 до 55 лет. Пациенты были разделены на 5 групп: I группа — острый очаговый туберкулез, II группа — фиброзно-очаговый туберкулез, III группа — инфильтративный туберкулез, IV и V группы — деструктивные изменения в виде острого кавернозного и фиброзно-кавернозного туберкулеза соответственно. Контролем исследования служили резецированные участки легких тех же больных, не пораженные специфическим процессом.

### Методы исследования:

1. Проводился анализ медицинской документации с целью выявления степени выраженности туберкулезного процесса по результатам бактериологического исследования мокроты и компьютерной рентгенографии.

2. Общая окраска гематоксилин-эозином применялась для выявления морфологических изменений в ткани легких и дифференцировки участков, пораженных и не пораженных микобактериями туберкулеза.

3. Для избирательного выявления аминсодержащих структур легких и адренергических нервных волокон применялся люминесцентно-гистохимический метод Фалька–Хилларпа в модификации Е.М. Крохиной [11]. Метод основан на реакции конденсации катехоламинов формальдегидом с образованием 1,2,3,4-тетрагидроизохинолинов, которые в результате дегидратации превращаются в интенсивно флуоресцирующие 3,2-дигидросоединения изохинолина. Эти продукты образуют люминесцирующий комплекс, дающий ярко-зеленую флуоресценцию. Карболины, которые в подобных реакциях формируют серотонин, дают белое и желтое свечение.

4. Концентрации КА и СТ в аминсодержащих структурах легких количественно оценивались с помощью цитоспектрофлуориметрии в течение первых 6–12 ч после наступления биологической смерти.

5. Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica 13.3 (StatSoft Inc., США). Статистическую достоверность определяли критерием Стьюдента (t). Для удобства при подсчете цифровые значения умножали на 100.

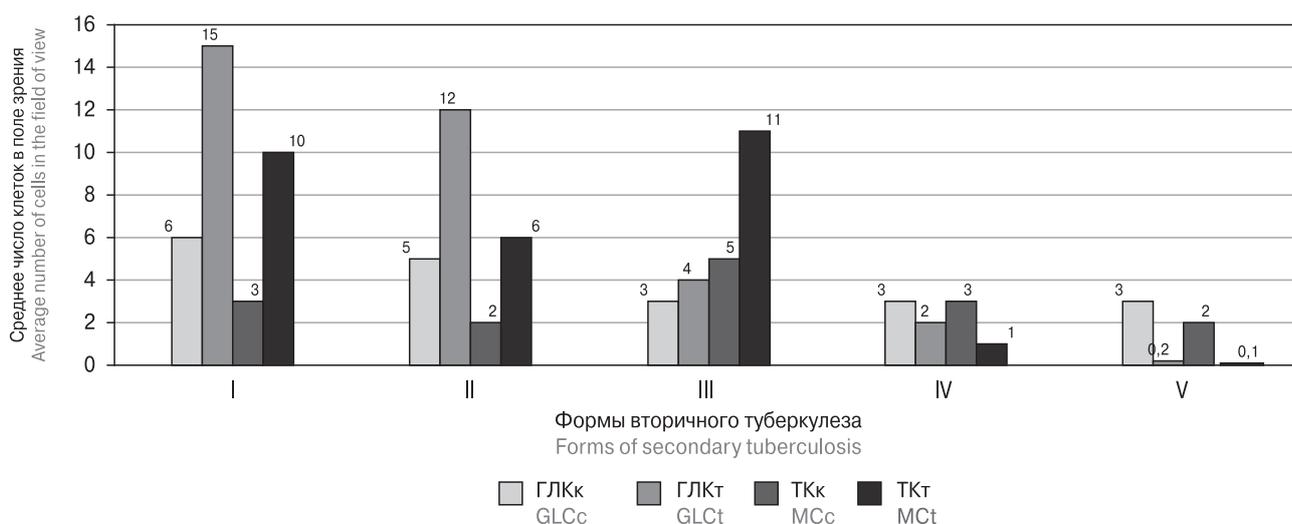
### Результаты

При определении локализации нейротрансмиттеров в биоаминсодержащих структурах легких было обнаружено, что сами микобактерии туберкулеза дают зеленое свечение при изучении их люминесцентно-гистохимическим методом Фалька–Хилларпа (рис. 1, II обложка). Содержание КА и СТ в тканях легких при туберкулезе распределено неравномерно. Пораженные и непораженные участки легких содержат разное количество моноаминов. На ранних этапах заболевания в местах локализации микобактерий резко увеличивается число макрофагов и ТК с повышенным содержанием в них практически всех нейроаминов (рис. 2, II обложка, табл.).

Так, в I группе исследуемых (острый очаговый туберкулез) число катехоламинсодержащих и серотонинсодержащих ГЛК преобладало над ТК (рис. 3). ГЛК располагались поодиночке внутри альвеол и группами в межальвеолярных промежутках. Содержание КА в них было наибольшим по сравнению с остальными нейроаминсодержащими структурами (рис. 4).

Число ТК варьировало от 8 до 12 в поле зрения (рис. 3). В контрольных участках легких обнаруживались клетки в основном с компактным расположением гранул и целостной цитолеммой. В местах поражения легких микобактериями встречались дегранулированные формы ТК, вокруг которых определялось диффузное люминесцирующее пространство, содержащее большое количество КА и СТ (рис. 4, 5, табл.).

Содержание КА во всех структурах резцированного легкого II группы исследуемых (фиброзно-очаговая форма туберкулеза), как



**Рисунок 3. Среднее число ГЛК и ТК в поле зрения в контрольном и пораженном участках легких**

Figure 3. The average number of GLC and TC in the field of view in control and affected areas of the lungs

**Примечания.** Подсчет в 10 полях зрения; к — контроль; т — туберкулез.

Notes. Count in 10 fields of view; c — control; t — tuberculosis.

в условно здоровом участке, так и в туберкулезном очаге, заметно нарастало в ГЛК (рис. 4). Наиболее значительные изменения содержания КА и СТ были отмечены во внутриальвеолярных и интерстициальных ГЛК (рис. 4, 5). По сравнению с I группой содержание их увеличилось в 1,5 и 1,2 раза соответственно (рис. 3).

В ТК этой группы содержание биогенных аминов в пораженном участке было ниже по отношению к контролю. Количественный показатель КА уменьшился в 3,1 раза, а СТ — в 1,1 раза (рис. 4, 5, табл.).

В III группе инфильтративный туберкулез характеризуется увеличением числа ТК по срав-

**Таблица. Содержание нейромедиаторов в биоаминсодержащих структурах легких при разных формах вторичного туберкулеза**

Table. Neurotransmitter content in bioamine-containing lung structures in different forms of secondary tuberculosis

№ группы Group No.	Формы вторичного туберкулеза Forms of secondary tuberculosis	Исследуемые структуры Examined structures		Содержание нейроаминов Neuroamine contents	
				КА CA	СТ ST
I	Острый очаговый туберкулез Acute focal tuberculosis	ГЛК GLC	Контроль Control	14,0±0,05	22,2±0,05
			Туберкулез Tuberculosis	20,7±0,06	23,4±0,05
		ТК MC	Контроль Control	13,7±0,05	25,6±0,05
			Туберкулез Tuberculosis	15,2±0,05	29,7±0,05
II	Фиброзно-очаговый туберкулез Fibrous-focal tuberculosis	ГЛК GLC	Контроль Control	25,3±0,1	26,2±0,05
			Туберкулез Tuberculosis	30,7±0,1	27,3±0,05
		ТК MC	Контроль Control	28,4±0,05	32,9±0,05
			Туберкулез Tuberculosis	8,9±0,05	31,2±0,05
III	Инфильтративный туберкулез Infiltrative tuberculosis	ГЛК GLC	Контроль Control	33,7±0,05	27,2±0,05
			Туберкулез Tuberculosis	46,8±0,05	56,2±0,05
		ТК MC	Контроль Control	27,8±0,05	29,5±0,03
			Туберкулез Tuberculosis	35,6±0,03	49,7±0,05
IV	Острый кавернозный туберкулез Acute cavernous tuberculosis	ГЛК GLC	Контроль Control	10,3±0,05	26,2±0,05
			Туберкулез Tuberculosis	10,6±0,03	22,2±0,06
		ТК MC	Контроль Control	36,8±0,05	35,6±0,05
			Туберкулез Tuberculosis	56,7±0,05	25,6±0,05
V	Фиброзно-кавернозный туберкулез Fibrous-cavernous tuberculosis	ГЛК GLC	Контроль Control	16,8±0,05	21,2±0,06
			Туберкулез Tuberculosis	23,7±0,05	9,2±0,03
		ТК MC	Контроль Control	15,4±0,02	13,6±0,05
			Туберкулез Tuberculosis	54,8±0,05	11,2±0,01

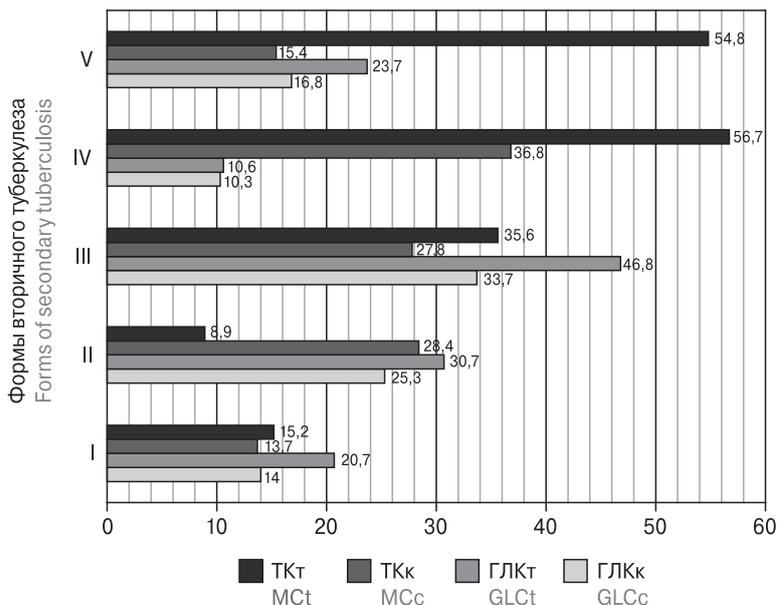
**Примечание.** Цифровые данные приведены в условных единицах.

Note. The data are presented as arbitrary units. MC — mast cells, GLC — granular luminescent cells, CA — catecholamines, ST — serotonin.

нению с ГЛК как в контрольной части легкого, так и на пораженном участке в 2,3 раза (рис. 3). В окрашенных срезах легких при этой форме туберкулеза была обнаружена люминесцирующая дорожка из лимфоцитов, что, по данным литературы [7, 10], может свидетельствовать об активации туберкулезного процесса. В целом специфический процесс в этой группе аналогичен процессу в предыдущей группе, но отличается количественным содержанием нейротрансмит-

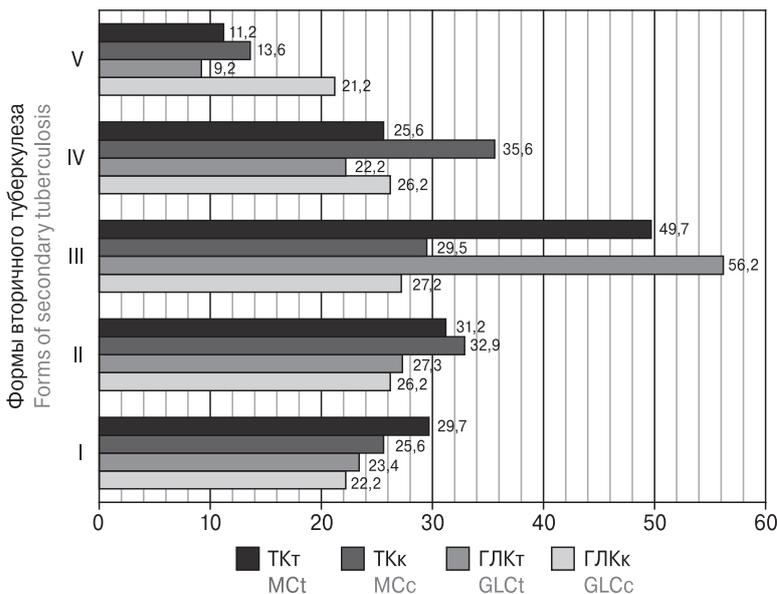
теров. При этом наибольшее насыщение КА выявлялось в волокнистых структурах легкого. ГЛК в просвете альвеол и межальвеолярном пространстве были единичны, в их цитоплазме были рассеяны мелкие гранулы, имеющие разное свечение, часть гранул не содержали нейроаминов, что в совокупности придавало клеткам «раздробленный» вид (рис. 3).

В области гранул число ТК и содержание КА и СТ в них в III группе исследуемых



**Рисунок 4. Количественное содержание катехоламинов в ГЛК и ТК контрольного и пораженного участков легких в условных единицах**

Figure 4. The quantity of catecholamines in GLC and MC of control and affected areas of the lungs (arbitrary units)



**Рисунок 5. Количественное содержание серотонина в ГЛК и ТК контрольного и пораженного участков легких в условных единицах**

Figure 5. The quantity of serotonin in GLC and MC of control and affected areas of the lungs (arbitrary units)

было повышено (табл., рис. 3). В цитоплазме клеток определялись мелкие гранулы с высоким содержанием биогенных аминов. Дегранулированные формы ТК численно преобладали над целостными в 2,3 раза.

Анализируя полученные данные, можно заключить, что продукты жизнедеятельности микобактерий вызывали выход нейроаминов из клеток продуцентов — ГЛК и ТК.

В IV группе исследуемых аутопсий легких при остром кавернозном туберкулезе наблюдались деструктивные изменения легочной ткани и более выраженные изменения со стороны нейротрансмиттерной системы. Концентрация КА в ГЛК в контроле и пораженном участке легкого отличалась наиболее низкими показателями по сравнению со всеми другими исследуемыми группами (рис. 4, табл.). Содержание СТ в ГЛК пораженного участка было ниже контрольного порога в 1,2 раза (рис. 5). При люминесцентном исследовании ГЛК выглядели раздробленными, что означало отсутствие моноаминов в некоторых гранулах (рис. 2). Кроме того, между отдельными видами макрофагов были обнаружены контакты. Можно допустить, что именно микобактерии изменяли содержание нейроаминов в нейроаминпродуцирующих клетках.

При данной форме туберкулеза наблюдалась тотальная дегрануляция ТК. Целые ТК встречались редко, не более 1–2 в поле зрения. В этом случае содержание КА в них было увеличено по сравнению с контролем в 1,6 раза (рис. 4, табл.), а концентрация СТ снижена в 1,4 раза (рис. 5). Нервные волокна в местах поражения микобактериями также были изменены. Они не имели четкости люминесценции, в некоторых местах у них отсутствовали варикозные расширения, волокна выглядели «оплывшими».

В V группе (фиброзно-кавернозный туберкулез легких) выраженность туберкулезного воспаления оказалось наибольшей по сравнению с результатами остальных групп. ГЛК с ТК находились в состоянии дегрануляции. ГЛК в своем составе имели нелюминесцирующие гранулы с нулевым содержанием КА. В оставшихся единичных цельных ГЛК и ТК пораженных микобактериями участков легких содержание КА в несколько раз превышало показатели контрольной зоны, а содержание СТ, наоборот, имело тенденцию к снижению по отношению к контролю (рис. 4, 5). Наибольшую, диффузного характера, люминесценцию имели эластические волокна: очевидно, они адсорбировали на себя излишки нейроаминов. В ткани легких также было отмечено появление единичных адипоцитов и большого числа люминесцирующих лимфоцитов, что совпадает с литературными данными по введению корпускулярного антигена [6].

В местах поражения лимфоциты во множестве определяются с люминесцирующими и нелюминесцирующими ядрами. По данным литературы, этот факт свидетельствует о том, что здесь имеются разнофункциональные клетки: как Т-, так и В-лимфоциты [5, 7]. Кроме того, в большом числе определяются нейтрофилы, также с люминесцирующими и нелюминесцирующими ядрами, и банальные макрофаги, содержащие в цитоплазме люминесцирующие желтым цветом частицы. Вероятнее всего, данные частицы являются микобактериями туберкулеза. Этот факт наталкивает на вопрос о том, как попали микобактерии в моноаминсодержащие клетки: путем фагоцитоза макрофагами, или, наоборот, микобактерии активно внедрились в эти клетки.

## Обсуждение

При исследовании разных форм туберкулеза нами выявлено, что КА содержат и микобактерии. Возникает вопрос: как взаимодействуют между собой микобактерии и катехоламинпродуцирующие клетки вместе с адренергическими нервными волокнами? При остром очаговом и фиброзно-очаговом туберкулезе ГЛК количественно преобладают над ТК. Содержание КА и СТ в этих двух популяциях клеток увеличено по сравнению с контролем. Основные аминопродуцирующие и аминоплотительные свойства в данном случае могут характеризовать ГЛК как макрофаги и клетки, относящиеся к APUD-системе (amine — амины, precursor — предшественники аминов, uptane — накопление, decarboxylation — декарбоксилирование), так как имеют все признаки таких клеток [10]. В этом случае ГЛК реагируют на внедрение микобактерий, увеличивая содержание КА путем увеличения числа продуцентов.

При инфильтративной форме туберкулеза ТК количественно преобладают над ГЛК. Содержание изучаемых нейротрансмиттеров в них остается высоким по сравнению не только с контролем, но и с первыми двумя группами. При данной форме туберкулеза основным контролирующим звеном специфического воспалительного процесса являются ТК, что совпадает с данными литературы [1].

При остром кавернозном туберкулезе число ГЛК и ТК резко снижается, скорее всего, за счет их повышенной дегрануляции, которая сопровождается выходом нейроаминов из них. При этом свечение КА и СТ в ГЛК остается равным значениям контроля, а в ТК резко повышается содержание КА (в 1,6 раза) и снижается СТ (в 1,4 раза). Можно предположить, что микобактерии частично разрушают продуценты КА путем внедрения внутрь клеток с использо-

ванием КА для процессов жизнедеятельности или путем блокирования рецепторного аппарата ГЛК и ТК.

При фиброзно-кавернозном туберкулезе, по сравнению с острым кавернозным туберкулезом, число биоаминсодержащих ТК и ГЛК резко снижено. ТК в основном выявляются в состоянии дегрануляции. Люминесценция нейротрансмиттеров в ТК и ГЛК имеет одинаковую тенденцию в отношении КА в сторону повышения, а в отношении СТ — в сторону понижения по сравнению с контролем. При этой форме увеличивается число люминесцирующих и нелюминесцирующих лимфоцитов, вероятнее всего, натуральных киллеров, число нейтрофилов и банальных макрофагов [6, 8], заполненных микобактериями туберкулеза. В данном случае также происходит разрушение нейроаминпродуцирующих и нейроаминдепонирующих структур микобактериями. Можно предположить, что такой процесс приводит не только к полному нарушению восстанавливающей функции легких и дегенерации нейроаминпродуцирующих клеток в них, но и к полному разрушению участка легких, пораженного микобактериями туберкулеза. Известно, что КА влияют на иммунный процесс, усиливая его [4, 5]. Опираясь на результаты нашего исследования, можно предположить, что микобактерии способны подавлять иммунный процесс. При нехватке КА и СТ процесс регенерации тканей изменяется, увеличивается содержание соединительной ткани, что мы и наблюдаем в V группе исследования, при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких.

## Выводы

1. Одним из методов определения микобактерий туберкулеза и содержания катехоламинов и серотонина в них может быть люминесцентно-гистохимический метод Фалька—Хилларпа.

2. При малых формах вторичного туберкулеза увеличивается число нейроаминсодержащих клеток, при инфильтративном туберкулезе число клеток отличается от контроля незначительно, а при деструктивных изменениях тканей легких, пораженных специфическим воспалительным процессом, наблюдается их разрушение.

3. Содержание катехоламинов в гранулярных люминесцирующих клетках в зонах специфического воспаления было увеличено по сравнению с контролем при всех изучаемых формах туберкулеза. Содержание серотонина имело тенденцию к увеличению при малых и инфильтративной формах туберкулеза, с резким снижением его свечения при деструктивных формах.

4. Содержание катехоламинов в тучных клетках в участках специфического воспаления было повышено по сравнению с контролем во всех изучаемых группах, за исключением фиброзно-очагового туберкулеза. Уровень серотонина в них зависел от формы туберкулеза. Максимальное его содержание определялось при инфильтративной форме, а значительное снижение — при деструктивных формах туберкулеза.

5. Сопоставление полученных результатов и анализ литературных данных позволяет говорить о действии микобактерий туберкулеза как корпускулярного антигена, способствующего гибели нейроаминопродуцентов.

## Список литературы/References

1. Бережная Н.М., Сепиашвили Р.И. Тучные клетки и гистамин: физиологическая роль // Аллергология и иммунология. 2003. Т. 4, № 3. С. 29–38. [Berezhnaja N.M., Sepiashvili R.I. Mast cells and histamine: physiological function. *Allergologia i immunologia = Allergy and Immunology*, 2003, vol. 4, no. 3, pp. 29–38. (In Russ.)]
2. Богатых С.П., Любовцева Л.А. Динамика содержания нейромедиаторов в структурах легких крыс в норме и после экспериментального воздействия природным газом // Современные проблемы науки и образования. 2012. Т. 5. С. 37–41. [Bogatyh S.P., Lyubovtseva L.A. Dynamics of neurotransmitters level in the structure of rat lungs under normal condition and experimental exposure to the natural gas. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Problems of Modern Science and Education*, 2012, vol. 5, pp. 37–41. (In Russ.)]
3. Воробьева О.В., Любовцева Л.А., Гурьянова Е.А. Серотонинсодержащие клетки в первичном органе кроветворения после аутологичной пересадки костного мозга // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 168, № 9. С. 355–358. [Vorobeva O.V., Lubovtseva L.A., Guryanova E.A. Serotonin-containing cells in the primary hematopoiesis organ after autologous bone marrow transplantation. *Bulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2019, vol. 168, no. 9, pp. 355–358. (In Russ.)]
4. Гималдинова Н.Е., Любовцева Л.А., Гималдинов Р.Ф., Воробьева О.В. Влияние циклоферона на распределение нейроаминов в биоаминсодержащих структурах селезенки // Вестник новых медицинских технологий. 2018. Т. 25, № 3. С. 101–106. [Gimaldinova N.E., Ljubovtseva L.A., Gimaldinov R.F., Vorob'eva O.V. The effects of cycloferon on the distribution of neuroamines in bioamine-containing structures of the spleen. *Vestnik novykh meditsinskih tekhnologii = Journal of New Medical Technologies*, 2018, vol. 25, no. 3, pp. 101–106. (In Russ.)]
5. Диндяев С.В., Виноградов С.Ю., Погорелов Ю.В., Торшилова И.Ю., Параскун А.А. Флуоресцентно-гистохимическое выявление катехоламинов и серотонина // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии. 2004. Т. 4, № 1. С. 84–85. [Dindyaev S.V., Vinogradov S.J., Pogorelov Yu.V., Torshilova I.Yu., Paraskun A.A. Fluorescent-histochemical detection of catecholamines and serotonin. *Aktual'nye problemy biologii, meditsiny i ekologii = Actual Problems of Biology, Medicine and Environment*, 2004, vol. 4, no. 1, pp. 84–85. (In Russ.)]

6. Любовцева Л.А., Воробьева О.В. Характеристика биоаминсодержащих клеток при введении собственного костного мозга // Медицина и образование в Сибири: сетевое научное издание. 2015. № 4. [Lyubovtseva L.A., Vorob'eva O.V. Characteristic of bioaminocontaining cells at introduction of self marrow. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri: setevoe nauchnoe izdanie* = *Medicine and Education in Siberia: online research journal*, 2015, no. 4. (In Russ.)] URL: [https://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/annotacy\\_eng.php?id=1871](https://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/annotacy_eng.php?id=1871)
7. Любовцева Е.В., Любовцева Л.А. Динамика нейромедиаторов в костном мозге крыс после иглоукалывания в точке гипоталамуса // Теоретическая и практическая медицина. 2010. Т. 8. С. 48–50. [Lyubovtseva E.V., Lyubovtseva L.A. Dynamics of neurotransmitters in the rat bone marrow after hypothalamus acupuncture. *Teoreticheskaja i prakticheskaja medicina* = *Theoretical and Practical Medicine*, 2010, vol. 8, pp. 48–50. (In Russ.)]
8. Любовцева Л.А., Тихонова Н.Н., Яшина Н.Е. Биоаминсодержащие структуры тимуса и костного мозга крыс при аутомиелотрансплантации // Морфология. 2006. Т. 129, № 2. С. 55–56. [Lyubovtseva L.A., Tihonova N.N., Yashina N.E. Bioamine-containing structures of rat thymus and bone marrow in automyelotransplantation. *Morfologiya* = *Morphology*, 2006, vol. 129, no. 2, pp. 55–56. (In Russ.)]
9. Мотавкин П.А. Клиническая и экспериментальная патофизиология легких // М.: Наука, 1998. 366 с. [Motavkin P.A. Clinical and experimental lung pathophysiology. *Moscow: Science*, 1998. 366 p. (In Russ.)]
10. Яглов В.В. Биология диффузной эндокринной системы. М.: МГАВМИБ, 1995. 32 с. [Yaglov V.V. Biology of diffuse endocrine system. *Moscow: Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology*, 1995. 32 p. (In Russ.)]
11. Falck B., Hillarp N.A., Thieme G., Torp A. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Citochem.*, 1962, vol. 10, pp. 348–354.

**Авторы:**

**Гималдинова Н.Е.**, к.м.н., доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия;

**Любовцева Л.А.**, д.б.н., член-корреспондент РАЕ, профессор кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия;

**Любовцева Е.В.**, д.м.н., профессор, зав. отделом научных технологий и инноваций Республиканского бюро судебно-медицинской экспертизы Минздрава Чувашии, г. Чебоксары, Россия.

**Authors:**

**Gimaldinova N.E.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary, Russian Federation;

**Lyubovtseva L.A.**, PhD, MD (Biology), RANH Corresponding Member, Professor, Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary, Russian Federation;

**Lyubovtseva E.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Scientific Technologies and Innovations, Republican Bureau of Forensic Medical Examination of the Ministry of Health of Chuvashia, Cheboksary, Russian Federation.

Поступила в редакцию 09.11.2020  
Отправлена на доработку 27.03.2021  
Принята к печати 31.10.2021

Received 09.11.2020  
Revision received 27.03.2021  
Accepted 31.10.2021

# RELATIONSHIP BETWEEN TYPE III SECRETION TOXINS, BIOFILM FORMATION, AND ANTIBIOTIC RESISTANCE IN CLINICAL *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATES

S. Derakhshan, A. Rezaee, Sh. Mohammadi

Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

**Abstract.** *Background and aim.* *Pseudomonas aeruginosa* is considered as a notorious pathogen due to its multidrug resistance and life threatening infections. We investigated the relationship between type III secretion toxins, biofilm formation, and antibiotic resistance among clinical *P. aeruginosa* isolates. *Methods.* A total of 70 genetically distinct clinical *P. aeruginosa* isolates were characterized for antibiotic resistance by disk diffusion assay. Biofilm formation was evaluated by microtiter plate method and presence of four *exo* genes (*exoS*, *exoU*, *exoT* and *exoY*) was investigated by PCR. A *p*-value < 0.05 was regarded statistically significant. *Results.* The most effective antibiotics were Meropenem and Piperacillin. Multidrug resistance was more prevalent in the ciprofloxacin-resistant isolates than in the susceptible isolates. The most frequently identified *exo* was *exoS* (37.1%). Genotype *exoS/exoT* was found in 4 isolates, while genotype *exoU/exoT* was not found. Prevalence of *exoS* was generally higher in the susceptible isolates than in the resistant isolates. A significant association was found between the formation of strong biofilm and resistance to antibiotics (*p* < 0.05). Prevalence of *exoY* and *exoU* was higher in the non-strong biofilm producers compared to the strong biofilm producers. *Conclusion.* Our study revealed formation of strong biofilm along with antibiotic resistance and the presence of *exo* genes in *P. aeruginosa* isolates. Knowledge of virulence gene profiles and biofilm formation may be useful in deciding appropriate treatment.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, type III secretion system, drug resistance, virulence, exoenzyme.

## ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ТОКСИНАМИ III ТИПА СЕКРЕЦИИ, ОБРАЗОВАНИЕМ БИОПЛЕНКИ И АНТИБИОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ В КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТАХ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Деракшан С., Резайи А., Мохаммади Ш.

Курдский университет медицинских наук, г. Сенендедж, Иран

**Резюме.** *Актуальность и цель.* *Pseudomonas aeruginosa* считается опасным патогеном из-за своей множественной лекарственной устойчивости и вызываемых им инфекций, представляющих угрозу для жизни. Мы исследовали взаимосвязь между токсинами секреции III типа, образованием биопленок и устойчивостью к антибиотикам среди клинических изолятов *P. aeruginosa*. *Методы.* Диско-диффузионный анализ был использован для оценки устойчивости к антибиотикам у 70 генетически различных клинических изолятов *P. aeruginosa*. Образование биопленок оценивали в микротитрационном планшете, а наличие четырех экзогенов (*exoS*, *exoU*, *exoT*

---

### Адрес для переписки:

Сафура Деракшан  
Иран, г. Сенендедж, Курдский университет медицинских наук.  
Тел.: +98 87 33668504.  
E-mail: s.derakhshan@muk.ac.ir

### Contacts:

Safoura Derakhshan  
Iran, Sanandaj, Kurdistan University of Medical Sciences.  
Phone: +98 87 33668504.  
E-mail: s.derakhshan@muk.ac.ir

---

### Для цитирования:

Деракшан С., Резайи А., Мохаммади Ш. Взаимосвязь между токсинами III типа секреции, образованием биопленки и антибиотической резистентностью в клинических изолятах *Pseudomonas aeruginosa* // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1075–1082. doi: 10.15789/2220-7619-RBT-1761

### Citation:

Derakhshan S., Rezaee A., Mohammadi Sh. Relationship between type III secretion toxins, biofilm formation, and antibiotic resistance in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1075–1082. doi: 10.15789/2220-7619-RBT-1761

и *exoY*) исследовали с помощью полимеразной цепной реакции. Значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым. **Результаты.** Наиболее эффективными антибиотиками оказались меропенем и пиперациллин. Множественная лекарственная устойчивость была более распространена у устойчивых, чем у чувствительных к ципрофлоксацину изолятов. Наиболее часто выявляемым экзоном был *exoS* (37,1%). Генотип *exoS/exoT* обнаружен у 4 изолятов, генотип *exoU/exoT* не выявлялся. Распространенность *exoS*, как правило, была выше у чувствительных изолятов, чем у устойчивых. Была обнаружена достоверная связь между образованием прочной биопленки и устойчивостью к антибиотикам ( $p < 0,05$ ). Распространенность *exoY* и *exoU* была выше у продуцентов непрочных биопленок, чем у продуцентов прочных биопленок. **Заключение.** Наше исследование, наряду с устойчивостью к антибиотикам и наличием экзогенов, выявило у изолятов *P. aeruginosa* способность к формированию прочной биопленки. Знание профиля генов вирулентности и образования биопленок может быть полезно при выборе соответствующего лечения.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, биопленка, система секреции III типа, лекарственная устойчивость, вирулентность, экзофермент.

## Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is a ubiquitous gram-negative bacterium capable of causing a wide range of diseases. Prominence of *P. aeruginosa* as a life threatening and a successful opportunistic pathogen is attributed to production of a diverse repertoire of virulence factors and its high resistance to diverse classes of antimicrobial agents [29]. Aminoglycosides, beta-lactams, and fluoroquinolones are three major classes of current anti-pseudomonal agents. Among these, fluoroquinolones are the best available agents for treatment. However, resistance to fluoroquinolones among *P. aeruginosa* has risen dramatically. More seriously, resistance to fluoroquinolones is often associated with cross-resistance to other antibiotics [14].

Furthermore, *P. aeruginosa* is well equipped with numerous pathogenic factors contributing to its virulence. Many of these factors are variable traits and their prevalence may vary from one type of infection to another type (i.e. they are present in some isolates but not in others) [20]. Type III secretion system (T3SS) is an important virulence determinant of *P. aeruginosa* that injects four exotoxins directly into host cells: Exoenzyme S (ExoS), Exoenzyme U (ExoU), Exoenzyme T (ExoT), and Exoenzyme Y (ExoY). The first identified *P. aeruginosa* T3SS toxins, ExoT and ExoS are closely related bifunctional proteins which are able to disrupt the host cell actin cytoskeleton, inhibit phagocytosis, induce host cell rounding, and cause cell death. ExoS and ExoT exhibit activity towards G-proteins of the Rho, Ras, Rac, and Cdc42 families [29]. ExoY is an adenylate cyclase that cleaves the intracellular cAMP in eukaryotic cells and causes cell rounding upon cocultivation with tissue culture cells. The fourth and the most virulent effector, ExoU, possesses phospholipase activity and disrupts eukaryotic membranes in many cell types. *P. aeruginosa* strains can be divided into two groups. ExoU and ExoT producing strains are poorly internalized and cause rapid host cell death. While, ExoS and ExoT producing strains are more efficiently internalized and cause slower cell killing. *P. aeruginosa* strains contain either *exoU* or

*exoS*, but rarely both [10]. Additionally, some studies reported that *exoS*<sup>+</sup> and *exoU*<sup>+</sup> strains have different antibiotic resistance patterns [29, 30]; therefore, they may require different therapeutic strategies.

Tendency to form biofilms in *P. aeruginosa* has also been correlated with its ability to cause severe infections. One of the main components of these biofilms is an exopolysaccharide called alginate, which is encoded by *algD* gene. The ability of *P. aeruginosa* to form biofilm further complicates the problem of its high antimicrobial resistance [20].

Knowledge of drug resistance patterns can be helpful in understanding and predicting clinical outcomes of patients and information about virulence gene profiles and biofilm formation may be useful for deciding appropriate antibiotic treatment. Given the importance of T3SS and biofilm in the pathogenesis of *P. aeruginosa* infections, this study was performed to determine relationship between T3SS toxins-encoding genes, antibiotic resistance, and biofilm formation in clinical *P. aeruginosa* isolates.

## Materials and methods

**Bacterial isolates and identification.** In this cross-sectional study, 70 *P. aeruginosa* isolates were collected from different specimens of patients admitted to two teaching hospitals in Sanandaj, Iran. Sanandaj is the capital of Kurdistan province in western Iran. Patients are referred to these two hospitals from all over the province. The isolates were identified as *P. aeruginosa* by the standard tests, including Gram staining, motility, pigment production, oxidase, hemolysis, odor, oxidation and fermentation test, lack of carbohydrate fermentation, and citrate assimilation [32]. The genetic diversity of the isolates was determined using the enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR [24].

The isolates were stored in Trypticase soy broth (TSB, Quelab Laboratories, Canada) containing 15% glycerol at  $-70^{\circ}\text{C}$  until further tests. This study was approved by Research Ethic Committee (REC) at Kurdistan University of Medical Sciences [IR.MUK.REC.1396.328].

**Antibiotic susceptibility test.** Antimicrobial susceptibility of the isolates was determined by the disk diffusion method according to the 2019 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [9]. The following antibiotic disks (all from Rosco, Denmark) from three antipseudomonal categories were tested: aminoglycoside [Amikacin (30 µg) and Gentamicin (10 µg)], beta-lactam [Cefepime (30 µg), Piperacillin (100 µg), Aztreonam (30 µg), Ceftazidime (30 µg), Meropenem (10 µg), and Imipenem (10 µg)], and Fluoroquinolone [Ciprofloxacin (5 µg)].

Briefly, Mueller–Hinton agar (Quelab Laboratories, Canada) plates were inoculated with the bacterial suspensions equal to the turbidity standard of 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  colony forming unit/mL). Antibiotic disks were placed onto the inoculated plates with the appropriate distance and the plates were then incubated at 35°C for 16–18 h. The inhibition zones around the disks were measured and interpreted according to the 2019 CLSI criteria [9].

**DNA extraction and detection of genes.** Genomic DNA was extracted using the boiling method. Overnight cultures of the isolates in TSB were centrifuged and Tris-EDTA (TE) buffer was added to the pellets. The suspensions were boiled at 100°C for 10 min and centrifuged. The supernatants were then collected and after qualitative evaluation on agarose gel (SinaClon, Iran) and quantitative evaluation by measuring the absorbance at 260 nm and by calculating the ratio of 260/280 to determine purity, were used as the DNA templates for subsequent experiments. The ratio of 260/280 within the range of 1.6–2 indicated the purity of DNA [15].

The *algD* and T3SS toxins-encoding genes *exoY*, *exoS*, *exoT*, and *exoU* were amplified by polymerase chain reaction (PCR) method using the specific primers shown in Table 1. PCR reaction was performed in a total volume of 25 µL as follows: 1X reaction buffer, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U Taq DNA polymerase (SinaClon, Iran), and 3 µL template DNA. The DNA was amplified in a thermal cycler (Eppendorf, Germany) using the following conditions: initial denaturation step (94°C for 5 min), followed by 30 cycles of denaturation (1 min at 94°C), annealing (1 min at different temperatures [Table 1]), and extension (1 min at 72°C), with a final extension at 72°C for 5 min.

The PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel in 0.5X Tris-Borate EDTA (TBE) buffer, stained with Safe Stain (SinaClon) and visualized by UV transilluminator. A 100 bp Plus DNA ladder (SinaClon) was used as a size marker.

**Biofilm formation assay.** Biofilm formation was performed according to the method of O’Toole [22]. Overnight cultures of the isolates were diluted to the turbidity equal to a McFarland 0.5 standard in TSB medium and 100 µL of the each dilution were loaded into the wells of a flat-bottom 96-well microtiter plate (Jet Biofil, China). After 24 h incubation at 37°C for biofilm formation, the supernatants were removed and the wells were washed twice with distilled water. After discarding the planktonic cells, the wells were stained with an aqueous solution of crystal violet (0.1%, w/v) for 15 min at room temperature and washed twice with distilled water. The microtiter plates were then dried for a few hours. The bound dye was solubilized in 125 µL of 30% (v/v) acetic acid and the plates were kept for 15 min at room temperature to extract bound dye. The optical density (OD) of each well was measured by using a microplate reader (Anthos Labtec, Netherlands) at 550 nm. *S. aureus* ATCC 25923 (biofilm forming) and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (not biofilm-forming) were used as controls. Sterile TSB was used as the negative control. For biofilm formation assay, 4 wells per strain were used and each test was repeated three times.

Biofilm density was classified according to the scheme of Stepanovic et al. [27]. The cut-off value (OD<sub>c</sub>) for each microtiter plate was defined as three standard deviations (SD) above the mean OD of the negative control: OD<sub>c</sub> = average OD of negative controls + (3 × SD of negative controls). Isolates were then classified into the following categories, based on the average OD of the strain:

- OD ≤ OD<sub>c</sub> = no biofilm producer;
- OD<sub>c</sub> ≤ OD ≤ 2OD<sub>c</sub> = weak biofilm producer;
- 2OD<sub>c</sub> ≤ OD ≤ 4OD<sub>c</sub> = moderate biofilm producer;
- 4OD<sub>c</sub> ≤ OD = strong biofilm producer.

**Statistical analysis.** SPSS software version 16 (SPSS Inc., USA) was used for statistical analysis. Pearson chi-square test and Fisher’s exact test (where appropriate) were used to determine the relationships. A p-value < 0.05 was regarded statistically significant. Multidrug-resistant (MDR) was defined as non-

**Table 1. Primer sequences, annealing temperatures and expected amplicon size**

Target gene	Primer sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Size of fragments (bp)	Reference
<i>exoS</i>	CTTGAAGGGACTCGACAAGG/TTCAGGTCCGCGTAGTGAAT	58	504	[7]
<i>exoU</i>	CCGTTGTGGTGCCGTTGAAG/CCAGATGTTACCGACTCGC	61	134	[7]
<i>exoT</i>	CAATCATCTCAGCAGAACCC/TGTCGTAGAGGATCTCCTG	55	1159	[3]
<i>exoY</i>	TATCGACGGTCATCGTCAGGT/TTGATGCACTCGACCAGCAAG	61	1035	[3]
<i>algD</i>	ATGCGAATCAGCATCTTTGGT/CTACCAGCAGATGCCCTCGGC	57	1310	[7]

**Table 2. Antimicrobial cross resistance pattern of ciprofloxacin-resistant versus ciprofloxacin-susceptible isolates of clinical *Pseudomonas aeruginosa***

Agents	Resistance pattern	In Cp-susceptible isolate (n = 29)	In Cp-resistant isolate (n = 41)	In total (n = 70)
One	Cp	0	1	1
	Gm	6	0	6
Two	AT, Cp	0	2	2
	Cp, Gm	0	10	10
Three	Ak, Cp, Gm	0	1	1
Three, MDR*	PM, AT, Cp	0	1	1
	AT, IP, Gm	1	0	1
	PM, Cp, Gm	0	1	1
	Cp, Gm, Pi	0	1	1
	AT, IP, Pi	1	0	1
	AT, Cp, Gm	0	1	1
Five, MDR	PM, AT, Cp, IP, MP	0	1	1
	TZ, PM, AT, Cp, Gm	0	5	5
	Ak, AT, Cp, IP, Gm	0	1	1
	Ak, AT, Cp, Gm, Pi	0	1	1
Six, MDR	Ak, AT, Cp, IP, MP, Gm	0	1	1
	Ak, PM, AT, Cp, IP, Gm	0	1	1
	TZ, Ak, PM, AT, Cp, Gm	0	1	1
	TZ, PM, AT, Cp, IP, Gm	0	1	1
Seven, MDR	TZ, Ak, PM, AT, Cp, IP, Gm	0	1	1
	TZ, Ak, PM, AT, Cp, Gm, Pi	0	2	2
	TZ, Ak, AT, Cp, IP, Gm, Pi	0	1	1
Eight, MDR	Ak, PM, AT, Cp, IP, MP, Gm, Pi	0	1	1
	TZ, PM, AT, Cp, IP, MP, Gm, Pi	0	2	2
	TZ, Ak, PM, AT, Cp, IP, MP, Gm	0	1	1
	TZ, Ak, PM, AT, Cp, IP, Gm, Pi	0	1	1
Nine, MDR	TZ, Ak, PM, AT, Cp, IP, MP, Gm, Pi	0	2	2

Note. Cp — Ciprofloxacin, Pi — Piperacillin, AT — Aztreonam, IP — Imipenem, MP — Meropenem, TZ — Ceftazidime, PM — Cefepime, Gm — Gentamicin, Ak — Amikacin. \*MDR — multidrug resistant.

**Table 3. Virulence patterns of 70 clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates**

Virulence pattern	Isolates, N (%)
<i>exoS</i> <sup>+</sup> , <i>exoY</i> <sup>-</sup> , <i>exoT</i> <sup>-</sup> , <i>exoU</i> <sup>-</sup> , <i>algD</i> <sup>-</sup>	15 (21.4)
<i>exoS</i> <sup>+</sup> , <i>exoY</i> <sup>+</sup> , <i>exoT</i> <sup>-</sup> , <i>exoU</i> <sup>-</sup> , <i>algD</i> <sup>-</sup>	5 (7.1)
<i>exoS</i> <sup>-</sup> , <i>exoY</i> <sup>-</sup> , <i>exoT</i> <sup>-</sup> , <i>exoU</i> <sup>+</sup> , <i>algD</i> <sup>-</sup>	4 (5.7)
<i>exoS</i> <sup>+</sup> , <i>exoY</i> <sup>+</sup> , <i>exoT</i> <sup>+</sup> , <i>exoU</i> <sup>-</sup> , <i>algD</i> <sup>-</sup>	2 (2.85)
<i>exoS</i> <sup>+</sup> , <i>exoY</i> <sup>-</sup> , <i>exoT</i> <sup>+</sup> , <i>exoU</i> <sup>-</sup> , <i>algD</i> <sup>-</sup>	2 (2.85)
<i>exoS</i> <sup>+</sup> , <i>exoY</i> <sup>-</sup> , <i>exoT</i> <sup>-</sup> , <i>exoU</i> <sup>-</sup> , <i>algD</i> <sup>+</sup>	2 (2.85)
<i>exoS</i> <sup>-</sup> , <i>exoY</i> <sup>-</sup> , <i>exoT</i> <sup>-</sup> , <i>exoU</i> <sup>-</sup> , <i>algD</i> <sup>+</sup>	2 (2.85)
<i>exoS</i> <sup>-</sup> , <i>exoY</i> <sup>-</sup> , <i>exoT</i> <sup>-</sup> , <i>exoU</i> <sup>+</sup> , <i>algD</i> <sup>+</sup>	1 (1.4)
<i>exoS</i> <sup>-</sup> , <i>exoY</i> <sup>+</sup> , <i>exoT</i> <sup>-</sup> , <i>exoU</i> <sup>-</sup> , <i>algD</i> <sup>-</sup>	1 (1.4)
<i>exoS</i> <sup>-</sup> , <i>exoY</i> <sup>+</sup> , <i>exoT</i> <sup>-</sup> , <i>exoU</i> <sup>+</sup> , <i>algD</i> <sup>-</sup>	1 (1.4)
<i>exoS</i> <sup>-</sup> , <i>exoY</i> <sup>-</sup> , <i>exoT</i> <sup>-</sup> , <i>exoU</i> <sup>-</sup> , <i>algD</i> <sup>-</sup>	35 (50)

susceptible isolates to at least one agent in three or more different antimicrobial categories [18]. The isolates were classified as strong biofilm producers or non-strong (moderate and weak) biofilm producers for statistical purposes [13].

## Results

In this study, 70 genetically distinct strains of *P. aeruginosa* were isolated from different clinical specimens. The mean age of the patients was 56.3 years old. The youngest patient was a 27 year old male and the oldest was a 91 year old male. The age distribution of patients was as follows: 27–46 years (n = 22, 31.4%), 47–66 years (n = 30, 42.8%), and 67–86 years (n = 16, 22.8%).

Of the 70 isolates, 47 (67.1%) were isolated from males and 23 (32.9%) were from females. The majority of the strains were isolated from urine (n = 54, 77.1%) followed by tracheal secretions (n = 11, 15.7%), and blood (n = 5, 7.1%).

**Determination of antibiotic susceptibility.** The most effective antibiotics were Meropenem (n = 62, 88.6% sensitivity) and Piperacillin (n = 58, 82.8% sensitivity). They were excluded from statistical analysis of difference among groups. The sensitivity to other antibiotics was as follows: Amikacin 55 (78.6%), Imipenem 54 (77.1%), Ceftazidime 53 (75.7%), Cefepime 49 (70%), and Aztreonam 41 (58.6%). The least effective antibiotics were Ciprofloxacin (n = 29, 41.4% sensitivity) and Gentamicin (n = 27, 38.6% sensitivity).

A total of 27 resistance patterns were detected in the 70 isolates, while 21 isolates (30%) were susceptible to all tested antibiotics. The patterns ranged from resistance to one antibiotic to all the 9 antibiotics. Of the 70 isolates, 7 isolates (10%) were resistant to one agent, 31 (44.3%) to 2 to 6 agents, and 11 (15.7%) isolates showed resistance to 7 to 9 agents. The most frequently detected pattern was resistance to Ciprofloxacin and Gentamicin combination (10/70, 14.3%) followed by resistance to Gentamicin (6/70, 8.6%). Of the 70 isolates, 29 were MDR (41.4%). Co-resistance to three antipseudomonal categories (fluoroquinolone, beta-lactam, and aminoglycoside) was found in 25 of the 70 isolates (35.7%) (Table 2).

Furthermore, pattern of resistance to other antibiotics was determined in the Ciprofloxacin-susceptible and -resistant isolates (Table 2). In the 29 Ciprofloxacin-susceptible isolates, 8 isolates (27.6%) were resistant to 1 to 3 agents and no isolate was resistant to 5 to 9 agents. However, in the 41 Ciprofloxacin-resistant isolates, 18 isolates (43.9%) were resistant to 1 to 3 agents, and 23 isolates (56.1%) showed resistance to 5 to 9 agents. Multidrug resistance was found in 27 (65.9%) of the 41 Ciprofloxacin-resistant isolates, while only 2 (6.9%) of the 29 Ciprofloxacin-susceptible isolates were MDR.

**Prevalence of genes.** The genes encoding Exo toxins were found in 33 of the 70 isolates (47.1%),

while 35 isolates (50%) carried no virulence genes. Of the 70 isolates, 26 (37.1%) carried the *exoS* gene, 9 (12.8%) the *exoY*, 6 (8.6%) the *exoU*, and 4 isolates (5.7%) carried the *exoT* gene. The *algD* was found in 5 isolates (7.1%). The simultaneous presence of two genes was found in 11 isolates and only 2 isolates carried three genes simultaneously (*exoS*, *exoY*, and *exoT*). Both strains were isolated from urine and showed susceptibility to all tested antibiotics. No isolate carried the simultaneous presence of four or five genes. Genotype *exoS/exoT* was found in 4 isolates, while genotype *exoU/exoT* was not found. None of the *exoU*<sup>+</sup> isolates harbored the *exoS* (Table 3).

Because there are studies that reported *exoS*<sup>+</sup> and *exoU*<sup>+</sup> strains have different antibiotic resistance patterns [29, 30]; we determined the prevalence of *exoS* in the antibiotic-susceptible and -resistant isolates. With the exception of Gentamicin, the prevalence of *exoS* was higher in the susceptible isolates than in the resistant isolates, although it was not significant. The *exoS* was found more frequently in the isolates susceptible to Ciprofloxacin followed by Cefepime, Imipenem, and Amikacin (Fig. 1). Multidrug resistance was found in 10 of the 26 *exoS*<sup>+</sup> isolates (38.5%).

**Biofilm assay.** Of the 70 isolates studied, all formed biofilm; of which 35 isolates (50%) formed strong biofilm, 28 isolates (40%) moderate biofilm, and only 7 isolates (10%) formed weak biofilm.

The resistant isolates formed strong biofilm more frequently compared to the susceptible isolates. The formation of strong biofilm was more frequently found in the isolates resistant to Cefepime followed by Ceftazidime, and Aztreonam. Significant associ-

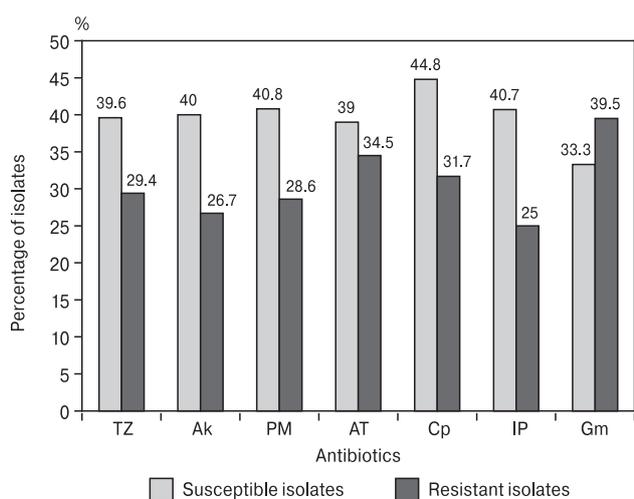
ations were seen between formation of strong biofilm and resistance to Cefepime ( $P = 0.019$ ), Aztreonam ( $P = 0.008$ ), and Ciprofloxacin ( $P = 0.008$ ) (Fig. 2).

In addition, the prevalence of *exo* genes was determined in the 35 strong and the 35 non-strong (moderate + weak) biofilm producers. The *exoS* and *exoT* were equally distributed between the two groups (37.1% and 5.7%, respectively); however, the prevalence of *exoY* and *exoU* was higher in the non-strong biofilm producers compared to the strong biofilm producers (20% vs. 5.7% for the *exoY*, and 11.4% vs. 5.7% for the *exoU*, respectively). All of the five *algD*-positive isolates formed strong biofilm.

## Discussion

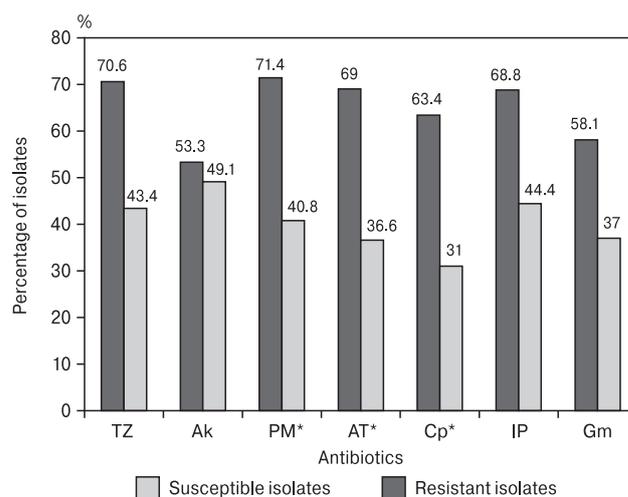
*P. aeruginosa* is considered as a notorious pathogen due to its multidrug resistance and life-threatening infections [29]. Our strains were mostly isolated from inpatients and the majority of patients (42.8%) were between 47–66 years old, which can be explained by the fact that *P. aeruginosa* infections mostly occur in people in the hospital and/or with the weakened immune systems [4].

Fluoroquinolones, aminoglycosides, and beta lactams are three main antimicrobial classes with reliable antipseudomonal activity. Among these, fluoroquinolones are the best available treatment option [14]. A relatively high percentage of our isolates (58.6%) showed resistance to ciprofloxacin which is in agreement with previous studies in Pakistan [25] and Egypt [2]. The widespread use of fluoroquinolones both in human and veterinary medicine may be responsible for the high resistances to this class. In addition, resistance to fluoroquinolones was significant-



**Figure 1. Prevalence of *exoS* virulence gene in antibiotic-resistant and antibiotic-susceptible isolates of 70 clinical *Pseudomonas aeruginosa***

**Note.** TZ — Ceftazidime, Ak — Amikacin, PM — Cefepime, AT — Aztreonam, Cp — Ciprofloxacin, IP — Imipenem, Gm — Gentamicin.



**Figure 2. Prevalence of strong biofilm producers in antibiotic-resistant and susceptible isolates of clinical *Pseudomonas aeruginosa***

**Note.** TZ — Ceftazidime, Ak — Amikacin, PM — Cefepime, AT — Aztreonam, Cp — Ciprofloxacin, IP — Imipenem, Gm — Gentamicin. \* — P-value less than 0.05.

ly associated with cross resistance to other agents [14]. In our study, MDR isolates were more frequently detected in the ciprofloxacin-resistant isolates.

*P. aeruginosa* is well equipped with numerous pathogenic factors contributing to its virulence. T3SS in *P. aeruginosa* is an important virulence factor that transports four proteins: ExoU, ExoS, ExoY and ExoT [29]. In our study, *exoS* showed the highest prevalence (37.1%). In southern Iran [16] 35.8% and in Bulgaria [28] 37.6% of the isolates carried *exoS*, which were similar to our report. However, studies in central Iran and Poland reported the prevalence rates of 77.7% [19] and 88.4% [23] for *exoS*, respectively, which were higher than that in our study.

While in our work the prevalence of *exoT* was 5.7%, which was similar to a study in northwestern Iran (5%) [5], it was markedly lower than those reported by others. For example, in central Iran [12] and in Poland [23], the prevalence rates of 20.4 and 94.4% were reported, respectively. Moreover, we observed a low prevalence of the *exoY* (12.8%); while, in the northwest of Iran, 55% [5] and in India, 91.3% [26] of *P. aeruginosa* isolates carried the *exoY*. The prevalence of the fourth gene, *exoU* in our study was 8.6%. However, in a study from Iran a rate of 42.8% [19] and in Egypt a prevalence of 33% [2] were reported for *exoU*. The lower prevalence of *exo* genes in our study may be due to differences in the source of isolates or geographical regions. Many of the *P. aeruginosa* virulence factors are variable traits and they are found in some isolates, but not in others [20]. For example, Choy et al. reported that the *exoU* is commonly found in *P. aeruginosa* strains isolated from keratitis [8], whereas it occurs at low prevalence in the non-ocular isolates [30] or the prevalence of *exoS* was significantly higher in isolates from blood than those obtained from respiratory infections [28]. In addition, it is possible that our strains were isolated from chronic infections. The expression of the T3SS has been found to be downregulated in isolates from chronic phase of infection, which is consistent with the notion that persistence of bacteria in the host requires the down-regulation of many virulence factors [10].

In our study, a disagreement was seen in the distribution of *exoS* and *exoU* genes, in consistent with other studies [10, 29, 30]. The *exoU* gene is located within a genomic island and its acquisition may cause loss of the *exoS* [17]. The T3SS system and its effectors were probably acquired by horizontal DNA transmission and antibiotic rich environments could promote the evolution of more virulent strains [10]. The prevalence of *exoS* in our study was generally

higher in the susceptible isolates compared to the resistant isolates. The higher prevalence of this gene may contribute to the pathogenesis of antibiotic susceptible isolates. The *exoS*<sup>+</sup> strains may be protected from the action of antibiotics due to their ability to invade mammalian cells and their residence inside cells [10]. Due to the small number of *exoU*<sup>+</sup> isolates, we couldn't determine association between the presence of *exoU* and drug resistance; however, the presence of *exoU* has been correlated to antibiotic resistance phenotypes in *P. aeruginosa* [1, 30]. The *exoU*<sup>+</sup> strains may have a survival advantage by having the potential to be more resistant.

Biofilm production has been considered as an important determinant of pathogenicity in *P. aeruginosa* infections by facilitating the emergence of antimicrobial drug resistance and by generating chronic infections. The alginate is the most important component of *P. aeruginosa* biofilms [20]. A low prevalence of *algD* (7.1%) was found in our isolates. The prevalence rates of 0 to 98% were reported for *algD* in different studies [2, 6, 11]. The low prevalence of *algD* in our study might be attributed to the high number of strains isolated from UTI. There are reports that contribution of alginate in the urinary tract is thought to be minimal [21, 31]. In addition, production of some other exopolysaccharides like Psl and Pel may contribute to the formation of biofilm in *P. aeruginosa* [20]. The prevalence of strong biofilm producers in our study was higher in the resistant isolates than in the susceptible isolates, especially for cefepime, aztreonam, and ciprofloxacin. The ability to form strong biofilm along with resistance to antibiotics may cause high rates of failure in therapy of *P. aeruginosa* infections. Furthermore, we found that *exoY* and *exoU* were more prevalent in the non-strong biofilm producers. These results may indicate the importance of *exoY* and *exoU* in the pathogenesis of non-strong biofilm producers of *P. aeruginosa*.

## Conclusion

In conclusion, findings of the present study showed a relatively different distribution of *exo* genes in clinical *P. aeruginosa* isolates from western Iran. The formation of strong biofilm along with antibiotic resistance and presence of *exo* genes may lead to severe diseases. Further in-depth studies are needed to determine whether gene linkage on mobile genetic elements underlies the relationships observed in our study. Knowledge of virulence gene profiles and biofilm formation may be useful for deciding appropriate treatment.

## References

1. Agnello M., Finkel S.E., Wong-Beringer A. Fitness cost of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* differs by type III secretion genotype. *Front Microbiol.*, 2016, vol. 7: 1591. doi: 10.3389/fmicb.2016.01591
2. Al Dawodeyah H.Y., Obeidat N., Abu-Qatouseh L.F., Shehabi A.A. Antimicrobial resistance and putative virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with respiratory tract infection. *Germs*, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 31–40. doi: 10.18683/germs.2018.1130

3. Alonso B., Fernández-Barat L., Di Domenico E.G., Marín M., Cercenado E., Merino I., de Pablos M., Muñoz P., Guembe M. Characterization of the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing ventilator-associated pneumonia. *BMC Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 1: 909. doi: 10.1186/s12879-020-05534-1
4. Al-Wrafy F., Brzozowska E., Górska S., Gamian A. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa*-the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*, 2017, vol. 71, pp. 78–91. doi: 10.5604/01.3001.0010.3792
5. Azimi S., Kafil H.S., Baghi H.B., Shokrian S., Najaf K., Asgharzadeh M., Yousefi M., Shahrivar F., Aghazadeh M. Presence of *exoY*, *exoS*, *exoU* and *exoT* genes, antibiotic resistance and biofilm production among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Northwest Iran. *GMS Hyg. Infect. Control*, 2016, vol. 11: Doc04. doi: 10.3205/dgkh000264
6. Badamchi A., Masoumi H., Javadinia S., Asgarian R., Tabatabaee A. Molecular detection of six virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in children with urinary tract infection. *Microb. Pathog.*, 2017, vol. 107: 44–47. doi: 10.1016/j.micpath.2017.03.009
7. Bogiel T., Depka D., Rzepka M., Kwiecińska-Piróg J., Gospodarek-Komkowska E. Prevalence of the genes associated with biofilm and toxins synthesis amongst the *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antibiotics*, 2021, vol. 10, no. 3: 241. doi: 10.3390/antibiotics10030241
8. Choy M.H., Stapleton F., Willcox M.D., Zhu H. Comparison of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens- and non-contact lens-related keratitis. *J. Med. Microbiol.*, 2008, vol. 57, no. 12, pp. 539–1546. doi: 10.1099/jmm.0.2008/003723-0
9. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30<sup>th</sup> ed. Wayne: CLSI, 2019. 282 p.
10. Engel J., Balachandran P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2009, vol. 12, no. 1, pp. 61–66. doi: 10.1016/j.mib.2008.12.007
11. Fazeli N., Momtaz H. Virulence gene profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. *Iran Red. Crescent Med. J.*, 2014, vol. 16, no. 10: e15722. doi: 10.5812/ircmj.15722
12. Haghi F., Zeighami H., Monazami A., Toutouchi F., Nazarian S., Naderi G. Diversity of virulence genes in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *Microb. Pathog.*, 2018, vol. 115, pp. 251–256. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.052
13. Horna G., Quezada K., Ramos S., Mosqueda N., Rubio M., Guerra H., Ruiz J. Specific type IV pili groups in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Microbiol.*, 2019, vol. 22, no. 1, pp. 31–41. doi: 10.1007/s10123-018-00035-3
14. Hsu D.I., Okamoto M.P., Murthy R., Wong-Beringer A. Fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors for acquisition and impact on outcomes. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2005, vol. 55, no. 4, pp. 535–541. doi: 10.1093/jac/dki026
15. Khare P., Raj V., Chandra S., Agarwal S. Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. *J. Forensic Dent. Sci.*, 2014, vol. 6, no. 2, pp. 81–85. doi: 10.4103/0975-1475.132529
16. Khoramrooz S.S., Rahbari N., Parhizgari N., Sharifi A., Yazdanpanah M., Gharibpour F., Rabani S.M., Malekhosseini S.A., Marashifard M. Frequency of type III secretion system cytotoxins-encoding genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *J. Adv. Med. Biomed Res.*, 2015, vol. 23, no. 99, pp. 52–63.
17. Kulasekara B.R., Kulasekara H.D., Wolfgang M.C., Stevens L., Frank D.W., Lory S. Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 2006, vol. 188, no. 11, pp. 4037–4050. doi: 10.1128/JB.02000-05
18. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect. J.*, 2012, vol. 18, no. 3, pp. 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
19. Mohamad M., Rostami S., Zamanzad B., Gholipour A., Deris F. Detection of exotoxins and antimicrobial susceptibility pattern in clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Avicenna J. Clin. Microbiol. Infect.*, 2018, vol. 5, no. 2, pp. 36–40. doi: 10.34172/ajcmi.2018.07
20. Moradali M.F., Ghods S., Rehm B.H. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, vol. 7: 39. doi: 10.3389/fcimb.2017.00039
21. Newman J.W., Floyd R.V., Fothergill J.L. The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS Microbiology Letters*, 2017, vol. 364, no. 15: fnx124. doi: 10.1093/femsle/fnx124
22. O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.*, 2011, vol. 47: 2437. doi: 10.3791/2437
23. Pobiega M., Chmielarczyk A., Kozioł J., Pomorska-Wesołowska M., Ziolkowski G., Romaniszyn D., Bulanda M., Wojkowska-Mach J. Virulence factors genes and drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains derived from different forms of community and healthcare associated infections. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2018, vol. 72, pp. 751–759. doi: 10.5604/01.3001.0012.2426
24. Saleem S., Bokhari H. Resistance profile of genetically distinct clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from public hospitals in central Pakistan. *J. Infect. Public Health*, 2020, vol. 13, no. 4, pp. 598–605. doi: 10.1016/j.jiph.2019.08.019
25. Samad A., Ahmed T., Rahim A., Khalil A., Ali I. Antimicrobial susceptibility patterns of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of respiratory tract infections in a Tertiary Care Hospital, Peshawar. *Pak. J. Med. Sci.*, 2017, vol. 33, no. 3, pp. 670–674. doi: 10.12669/pjms.333.12416
26. Shariff M., Chhabra S.K., Rahman M.U. Similar virulence properties of infection and colonization associated *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.*, 2017, vol. 66, no. 10, pp. 1489–1498. doi: 10.1099/jmm.0.000569
27. Stepanović S., Vuković D., Hola V., Bonaventura G.D., Djukić S., Čirković I., Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 2007, vol. 115, no. 8, pp. 891–899. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x
28. Strateva T., Markova B., Ivanova D., Mitov I. Distribution of the type III effector proteins-encoding genes among nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria. *Ann. Microbiol.*, 2010, vol. 60, pp. 503–509. doi: 10.1007/s13213-010-0079-3
29. Strateva T., Mitov I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann. Microbiol.*, 2011, vol. 61, pp. 717–732. doi: 10.1007/s13213-011-0273-y

30. Subedi D., Vijay A.K., Kohli G.S., Rice S.A., Willcox M. Association between possession of ExoU and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 9: e0204936. doi: 10.1371/journal.pone.0204936
31. Tielen P., Narten M., Rosin N., Biegler I., Haddad I., Hogardt M., Neubauer R., Schobert M., Wiehlmann L., Jahn D. Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2011, vol. 301, no. 4, pp. 282–292. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.10.005
32. Tille P. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. *St. Louis County: Elsevier Mosby*, 2015. 1056 p.

---

**Авторы:**

**Дерахшан С.**, к.н., Центр исследования печени и органов пищеварения, Курдский университет медицинских наук, г. Сенендедж, Иран;  
**Резайи А.**, м.н., студенческий научно-исследовательский комитет, Курдский университет медицинских наук, г. Сенендедж, Иран;  
**Мохаммади Ш.**, к.н., Исследовательский центр зоонозов, Научно-исследовательский институт развития здравоохранения, Курдский университет медицинских наук, г. Сенендедж, Иран.

**Authors:**

**Derakhshan S.**, PhD, Liver and Digestive Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran;  
**Rezaee A.**, MSc, Student Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran;  
**Mohammadi Sh.**, PhD, Zoonoses Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

---

Поступила в редакцию 30.06.2021  
Отправлена на доработку 30.08.2021  
Принята к печати 20.09.2021

---

Received 30.06.2021  
Revision received 30.08.2021  
Accepted 20.09.2021

# TOXOPLASMA GONDII INFECTION IN PATIENTS WITH MALIGNANT AND BENIGN BONE TUMOURS

M. Hajizadeh<sup>a</sup>, R. Falak<sup>a</sup>, M. Tavakoli-Yaraki<sup>a</sup>, R. Hosseinzadeh<sup>a</sup>, M. Alipour<sup>a</sup>,  
E. Ahmadpour<sup>b</sup>, R. Rafiei-Sefiddashti<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>b</sup> Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

**Abstract.** *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) is an intracellular parasite that infects humans, and seroprevalence of its infection varies from about 10 to 80 percent in different countries with a higher prevalence in warmer and humid regions. In this study, the rate of acute and chronic toxoplasmosis in patients with benign or malignant bone tumours was investigated. Fifty-three patients who suffered from various bone tumours, as well as sixty-five healthy controls with an unknown serological profile for anti-*Toxoplasma* antibodies, were enrolled in this cross-sectional study. Anti-*Toxoplasma* antibodies were detected in serum samples using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blood samples of them were used for real-time PCR. Thirty-two (60.32%) and twenty-one (39.63%) of patients had malignant tumours and benign tumours, respectively. The results showed a higher and significant seropositivity rate of IgM antibodies in primary bone tumour patients compared to the control group and *Toxoplasma* DNA became positive in 18.86% of patients with primary bone tumours and 6.15% of controls. Surprisingly, the high presence of parasite DNA was detected in patients with malignant tumours. The seroprevalence of *T. gondii* IgM antibodies and DNA positivity among the cancer patients were significantly higher than healthy individuals. Also, chronic toxoplasmosis (it was shown with IgG positive) appears to be more common in people with benign cancers than malignancies. The study showed a relatively high seroprevalence of anti-*T. gondii* antibodies in patients with primary bone cancer. However, the considerable rate of positive blood samples for the presence of parasite's DNA should not be ignored. A key to the effective management of diseases in immunosuppressed individuals is prompt and accurate diagnosis of toxoplasmosis. Moreover, it seems that PCR tests may be more reliable than serological methods and it could be considered as a precise method for diagnosis of acute toxoplasmosis.

**Key words:** primary bone tumour, malignant tumour, benign tumour, toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, real-time PCR.

## ИНФЕКЦИЯ, ВЫЗВАННАЯ TOXOPLASMA GONDII, У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ КОСТИ

Хаджизаде М.<sup>1</sup>, Фалак Р.<sup>1</sup>, Таваколи-Яраки М.<sup>1</sup>, Хоссейнзаде Р.<sup>1</sup>, Алипур М.<sup>1</sup>, Ахмадпур Э.<sup>2</sup>,  
Рафиеи-Сефиддашти Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Иранский университет медицинских наук, г. Тегеран, Иран

<sup>2</sup> Табризский университет медицинских наук, г. Табриз, Иран

**Резюме.** *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) — это внутриклеточный паразит, патогенный для человека. Распространенность соответствующей инфекции колеблется от 10 до 80% и наиболее высока она в странах с теплым и влажным климатом. В настоящем исследовании изучалась частота острого и хронического токсоплазмоза у паци-

---

### Адрес для переписки:

Рахелех Рафиеи-Сефиддашти  
Иран, г. Тегеран, Иранский университет медицинских наук.  
Тел.: +0098 912 340-43-82, +0098 218 670-32-63.  
E-mail: rafiei.r@iums.ac.ir

### Contacts:

Raheleh Rafiei-Sefiddashti  
Iran, Tehran, Iran University of Medical Sciences.  
Phone: +0098 912 340-43-82, +0098 218 670-32-63.  
E-mail: rafiei.r@iums.ac.ir

### Для цитирования:

Хаджизаде М., Фалак Р., Таваколи-Яраки М., Хоссейнзаде Р., Алипур М., Ахмадпур Э., Рафиеи-Сефиддашти Р. Инфекция, вызванная *Toxoplasma gondii*, у больных злокачественными и доброкачественными опухолями кости // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1083–1088. doi: 10.15789/2220-7619-TGI-1660

### Citation:

Hajizadeh M., Falak R., Tavakoli-Yaraki M., Hosseinzadeh R., Alipour M., Ahmadpour E., Rafiei-Sefiddashti R. *Toxoplasma gondii* infection in patients with malignant and benign bone tumours // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1083–1088. doi: 10.15789/2220-7619-TGI-1660

ентов с доброкачественными или злокачественными опухолями костей. В данном поперечном исследовании приняли участие 53 пациента, страдающих различными новообразованиями костей, а также 65 здоровых людей с неизвестным серологическим профилем антител против токсоплазмы, составивших контрольную группу. Антитела против токсоплазмы были обнаружены в образцах сыворотки с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), а образцы крови были использованы для ПЦР в реальном времени. 32 (60,32%) и 21 (39,63%) пациент имели злокачественные и доброкачественные опухоли соответственно. Более высокий и значимый уровень IgM-антител отмечен у пациентов с первичной опухолью кости в сравнении с группой контроля, а ДНК *Toxoplasma* была обнаружена у 18,86% пациентов с первичными опухолями костей и у 6,15% пациентов из контрольной группы. Неожиданным оказалось высокое содержание ДНК паразита у пациентов со злокачественными опухолями. Распространенность антител IgM к *T. gondii* и обнаружение ее ДНК среди онкологических больных были значительно выше, чем у здоровых людей. Кроме того, хронический токсоплазмоз (диагностированный по положительному результату теста на IgG), по-видимому, чаще встречается у людей с доброкачественными формами рака, чем со злокачественными новообразованиями. Исследование показало относительно высокую распространенность анти-*T. gondii* у пациентов с первичным раком кости. Однако нельзя не учитывать значительный процент положительных образцов крови на наличие ДНК паразита. Ключом к эффективному лечению заболеваний у людей с ослабленным иммунитетом является своевременная и точная диагностика токсоплазмоза. Более того, по-видимому, тесты ПЦР могут быть более надежными, чем серологические методы, и их можно рассматривать как точный метод диагностики острого токсоплазмоза.

**Ключевые слова:** первичная опухоль кости, злокачественная опухоль, доброкачественная опухоль, токсоплазмоз, *Toxoplasma gondii*, ПЦР в реальном времени.

## Introduction

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) is an obligatory intracellular parasite that infects humans and many animal species and approximately one-third of the world's population is at risk of infection with this protozoan [11, 25]. Seroprevalence of *T. gondii* infection varies from about 10 to 80 per cent in different countries with a higher prevalence in warmer and humid regions [8, 9, 26]. Host immune system plays the most important role in pathological symptoms of toxoplasmosis, for example, immunocompetent individuals rarely show considerable signs, however, this infection in immunocompromised persons may lead to severe diseases such as encephalitis, pneumonia, retinochoroiditis and even death [1, 31].

B lymphocytes produce various classes of antibodies in response to *T. gondii* infection which could be applied for serodiagnosis, like specific IgM which can be detected within 7–15 days in acute infection, however, class switching to IgG antibodies and production of a higher titer and avidity of this class of antibody is observed in chronic toxoplasmosis [12, 28]. Therefore, one of the easiest diagnostic tests for the routine detection of toxoplasmosis is a screening of specific IgG and IgM antibodies in serum, however; the application of molecular techniques may be more sensitive and appropriate methods for diagnosis of acute toxoplasmosis in high-risk patients especially in cancerous people with low traceable antibodies in consequence of radio or chemotherapy [2, 22, 25].

Cancer is one of the major causes of mortality worldwide and is the second leading one in developing countries [18]. Primary bone tumours impose a burden of mortality and morbidity with a wide range of clinical manifestations including pain, peripheral

inflammation and bone fractures on the patients, worldwide. Various histological types of primary bone tumours include benign (osteochondroma, giant cell tumour, exostosis) and malignant (osteosarcoma, Ewing's sarcoma, chondrosarcoma) tumours with nonspecific symptoms which make it difficult to be managed by clinicians [10, 30].

Toxoplasmosis can cause opportunistic life-threatening infection in cancer patients [4]. On the other hand, several studies hypothesized that *T. gondii* infection is responsible for the progression of malignant diseases due to inhibition of apoptosis and motility of macrophages [6]. Therefore, epidemiological studies are required to estimate the rate of infection in high-risk individuals, especially in immunocompromised patients with malignancies undergoing chemotherapy [1, 27]. A case-control study of 900 different cancer patients and 900 controls was conducted in China for evaluating the epidemiology of *T. gondii* infection and the results showed a high significant prevalence of anti *T. gondii* IgG in cancer patients but because of rare incidence of different bone tumours, this type of tumour hadn't been mentioned [7], so in this study, we aimed to evaluate the serum levels of IgG and IgM using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and determine parasite-specific DNA by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) in aforementioned patients.

## Materials and methods

Fifty-three patients who suffered from various bone tumours, as well as sixty-five healthy controls with an unknown serological profile for anti-*Toxoplasma* antibodies, were enrolled in this cross-sectional study.

tional study with local ethical approval and informed consent, from March to August 2019. The blood samples were collected from patients who were diagnosed for primary bone cancer and subjected to surgery at the Shafa Orthopedic Hospital. The patient group was divided into patients with benign tumour subgroups including osteochondroma, giant cell tumour (GGT), exostosis, and other types and patients with malignant tumour subgroups including osteosarcoma, Ewing's sarcoma, chondrosarcoma, and other sarcomas. Approximately five ml of blood was obtained from each participant and divided into two tubes. The tube with no anticoagulant was used for serum isolation to be applied in serological tests and the second tube containing EDTA was used for isolation of buffy coat leukocytes and subsequently DNA purification. All samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. The serum titre of anti-*T. gondii* antibodies (IgG and IgM) were measured using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the manufacturer's setting (Pishtazteb, Iran) and the absorbance was read by ELISA reader (Biohit, BP800, Finland) at 450 nm versus 630 nm. All experiments were performed in duplicate and equivocal results were repeated [2, 29].

Genomic DNA was extracted from the isolated buffy coat samples using DNA extraction mini kit (YTA Co., Iran) according to the manufacturer's instruction. Specific primers for repeated element (RE) gene of *T. gondii* (F 5'-AGG GAC AGA AGT CGA AGG GG-3' and R 5'-GCA GCC AAG CCG GAA ACA TC-3') was designed using NCBI blast software [3]. The DNA samples were tested for the presence of the 164-bp fragment of RE gene of *T. gondii* by real-time PCR machine (Rotor-Gene Q, Qiagen, USA), in 20  $\mu\text{l}$  volumes, as previously described [3]. Briefly, 1  $\mu\text{g}$  of DNA template was added to SYBR Green PCR Master Mix (YTA Co., Iran). Afterwards, 0.8  $\mu\text{l}$  of each forward and reverse primers with a concentration of 1 pmol/ $\mu\text{l}$  was added and distilled water was used for volume adjustment. Quantitative PCR (qPCR) was performed at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 40 cycles at  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  for 30 s, and  $72^{\circ}\text{C}$  for 30 s. The PCR experiments were repeated three times.

**Statistics.** Data were recorded and analysed with the SPSS v.18 software (SPSS Inc., Chicago, ILL, USA) using Mann-Whitney and Chi-square tests. The p-value  $< 0.05$  was considered as significant.

**Table 1. Demographics data of bone cancer patients and healthy individuals**

Characteristics		Number of patients (n = 53)	Number of healthy individuals (n = 65)
Gender	Female	24 (45.28%)	51 (78/46%)
	Male	29 (54.71%)	14 (21/53%)
Age	< 20 years old	14 (26.14%)	4 (6/15%)
	20–40 years old	26 (49%)	43 (66.15%)
	40–60 years old	7 (13.2%)	14 (21.53%)
	> 60 years old	6 (11.3%)	4 (6/15%)

## Results

The demographic data of the participants are presented in Table 1. Thirty-two (60.32%) and twenty-one (39.63%) of patients had malignant tumours and benign tumours, respectively. The results showed a higher and significant seropositivity rate of IgM antibodies in primary bone tumour patients compared to the control group (Table 2). All samples were tested by real-time PCR for *Toxoplasma* DNA which became positive in 18.86% of patients with primary bone tumours and 6.15% of controls. Surprisingly, the high presence of parasite DNA was detected in patients with malignant tumours (Table 2). We founded a higher IgG and IgM titer against *T. gondii* in patients with benign versus malignant bone tumours but PCR results in malignant patients had a higher percentage than benign patients and control group.

A p-value less than 0.05 was considered significant statistically and the seroprevalence of *T. gondii* IgM antibody and DNA positivity among the cancer patients were significantly higher than healthy individuals ( $p = < 0.001$  and  $p = 0.005$  respectively). Also, chronic toxoplasmosis (it was shown with IgG positive) appears to be more common in people with benign cancers than malignancies.

## Discussion

One of the accepted hypothesis is a higher incidence of opportunistic infections such as toxoplasmosis in cancer patients as a group of immunocompromised individuals [20], for example, the seroprevalence rate of *T. gondii* infection in Iran

**Table 2. Seropositivity rates for anti-*T. gondii* antibodies and parasite DNA positivity in primary malignant, benign bone tumour patients and control group**

Group	Subgroups	Number of samples	IgG positive			IgM positive			PCR positive		
			No.	%	p-value	No.	%	p-value	No.	%	p-value
Cancer patients	Malignant bone tumours	32	14	43.75	0.44	4	12.50	$< 0.001$	7	21.87	0.001
	Benign bone tumours	21	11	52.38	0.06	4	19.04	$< 0.001$	3	14.28	0.06
	Total patients	53	25	47.16	0.23	8	15.09	$< 0.001$	10	18.86	0.005
Controls	Controls	65	25	38.46		0	0		4	6.15	

was 45–51% in cancer patients but 39% in healthy individuals [1, 8]. However, the geographical factors, eating habits and livestock farming practices can be effective in the prevalence of this infection. Khabaz et al. showed that anti-*T. gondii* IgG was detected in 63.6% of patients with neoplasia and 58% of healthy controls, although, all of the participants (case and control groups) were negative for anti-*T. gondii* IgM antibodies [19]. *T. gondii* seroprevalence was 60.3% in immunocompromised patients and 33.3% in healthy individuals in other provinces during 2014–2015 [17]. Otherwise, the higher rate of *T. gondii* infection in immunocompromised individuals, such as cancer patients could be due to many reasons such as a difference in genetic susceptibility and the source of *Toxoplasma* infection [1, 32]. So, it might be concluded that a high incidence of acute toxoplasmosis in bone cancer patients could be due to impaired genetic system or decreased immunity to encounter this protozoan. The high rate of PCR results obtained for *T. gondii* DNA in cancer patients (18.86% against 6.15% in a healthy individual) could be a witness of this hypothesis and the lower immunity in malignant patients may be explained with more incidence of this infection in patients with malignant tumours versus benign types (21.87% and 14.28%, respectively). On the other hand, this parasite could remain silent in tissue cysts that are commonly formed in different organs such as the central nervous system and the situations such as the immune suppression in cancer patients or the therapeutic process can cause reactivation of parasite and latent toxoplasmosis [24]. So, this can account as another reason for a high percentage of positive PCR and IgM results in cancer.

In the current study, the findings emphasize raising the possible role of cancer on *T. gondii* infection susceptibility, because the seroprevalence of anti-*Toxoplasma* antibodies in patients was higher (47.16% versus 38.46%). The other hypothesis is the effect of persistent infection on the promotion of cancer due to rising mutation rates as a result of long-term host defence responses in inflammation situations [15]. Also, intercellular pathogens like *T. gondii* may disrupt cell barriers against oncogenic agents and might cause mutations after accumulating over time [14].

Interestingly, we observed that two PCR positive patients in the malignant group were negative for anti-

*Toxoplasma* IgM and IgG antibodies in ELISA which might be due to the recent infection or impaired immune response following immunosuppressive therapy. It was mentioned that serological tests could be sometimes inadequate for detecting active infection in immunosuppressed individuals, because the antibody titre may not rise enough to be detected [13, 23]. Overall, these patients are incapable of developing high titres of antibodies against *T. gondii*. Moreover, anti-neoplastic drug therapy could impair specific anti-*Toxoplasma* antibody production [16, 21].

Hence, serological methods alone have low reliability in both patients and healthy; it was strongly recommended that serologic tests should be combined with other diagnostic methods like gene amplification for accurate clinical diagnosis of active toxoplasmosis. Molecular methods are efficient techniques that allow specific amplification of DNA. The real-time qPCR could be successfully used to *T. gondii* diagnosis and is capable to detect low concentrations of target DNA [3, 22, 32]. Besides, to increase the specificity and sensitivity of immunological assays in immunocompromised patients, new antigenic targets should be designed the parasite to have a potential immunogenic antigen in immunodiagnostic tools of toxoplasmosis in patients with cancer [5].

## Conclusion

The study showed a relatively high seroprevalence of anti-*T. gondii* antibodies in patients with primary bone cancer. However, the considerable rate of positive blood samples for the presence of parasite's DNA should not be ignored. A key to the effective management of diseases in immunosuppressed individuals is prompt and accurate diagnosis of toxoplasmosis. Moreover, it seems that PCR tests may be more reliable than serological methods and it could be considered as a precise method for diagnosis of acute toxoplasmosis.

## Competing interests

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article. The sponsor or funding organization had no role in the design or conduct of this research.

## References

1. Ahmadpour E., Daryani A., Sharif M., Sarvi S., Aarabi M., Mizani A., Rahimi M.T., Shokri A. Toxoplasmosis in immunocompromised patients in Iran: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect. Dev. Ctries*, 2014, vol. 8, no. 12, pp. 1503–1510. doi: 10.3855/jidc.4796
2. Ahmadpour E., Pishkarie-Asl R., Spotin A., Samadi Kafil H., Didarlu H., Azadi Y., Barac A. Sero-molecular evaluation of *Toxoplasma gondii* infection among HIV-positive patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2019, vol. 113, no. 12, pp. 771–775. doi: 10.1093/trstmh/trz082
3. Ahmadpour E., Zargami E., Mahami-Oskouei M., Spotin A., Shahbazi A., Kafil H.S., Rajabi S., Alizadeh P., Azadi Y., Bahaj R., Shahrivar F., Barac A. Diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women using automated chemiluminescence and quantitative real time PCR. *Asian Pacific Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2019, vol. 12, no. 1, pp. 26–31.

4. Anvari D., Sharif M., Sarvi S., Aghayan S.A., Gholami S., Pagheh A.S., Hosseini S.A., Saberi R., Chegeni T.N., Hosseini Z., Daryani A. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Microb. Pathog.*, 2019, vol. 129, pp. 30–42. doi: 10.1016/j.micpath.2019.01.040
5. Arab-Mazar Z., Fallahi S., Koochaki A., Haghighi A., Tabaei S.J.S. Immunodiagnosis and molecular validation of Toxoplasma gondii-recombinant dense granular (GRA) 7 protein for the detection of toxoplasmosis in patients with cancer. *Microbiol. Res.*, 2016, vol. 183, pp. 53–59. doi: 10.1016/j.micres.2015.11.006
6. Carmen J.C., Sinai A.P. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Mol. Microbiol.*, 2007, vol. 64, no. 4, pp. 904–916. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05714.x
7. Cong W., Liu G.H., Meng Q.F., Dong W., Qin S.Y., Zhang F.K., Zhang X.Y., Wang X.Y., Qian A.D., Zhu X.Q. Toxoplasma gondii infection in cancer patients: prevalence, risk factors, genotypes and association with clinical diagnosis. *Cancer Lett.*, 2015, vol. 359, no. 2, pp. 307–313. doi: 10.1016/j.canlet.2015.01.036
8. Daryani A., Sarvi S., Aarabi M., Mizani A., Ahmadpour E., Shokri A., Shokri A., Rahimi M.T., Sharif M. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in the Iranian general population: a systematic review and meta-analysis. *Acta Tropica*, 2014, vol. 137, pp. 185–194. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.05.01
9. De la Luz Galvan-Ramirez M., Troyo R., Roman S., Calvillo-Sanchez C., Bernal-Redondo R. A systematic review and meta-analysis of Toxoplasma gondii infection among the Mexican population. *Parasites Vectors*, 2012, vol. 5, no. 1: 271. doi: 10.1186/1756-3305-5-271
10. Dorfman H.D., Czerniak B. Bone cancers. *Cancer*, 1995, vol. 75, no. 1, pp. 203–210. doi: 10.1002/1097-0142(19950101)75:1+<203::aid-cncr2820751308>3.0.co;2-
11. Dubey J., Jones J. Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States. *Int. J. Parasitol.*, 2008, vol. 38, no. 11, pp. 1257–1278. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.03.007
12. Dupont C.D., Christian D.A., Hunter C.A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin. Immunopathol.*, 2012, vol. 34, no. 6, pp. 793–813. doi: 10.1007/s00281-012-0339-3
13. Embil J., Covert A., Howes W., Tanner C., Staudt M. Visualization of Toxoplasma gondii in the cerebrospinal fluid of a child with a malignant astrocytoma. *Can. Med. Assoc. J.*, 1985, vol. 133, no. 3, pp. 213–214.
14. Ewald P.W. An evolutionary perspective on parasitism as a cause of cancer. *Adv. Parasitol.*, 2009, vol. 68, pp. 21–43. doi: 10.1016/S0065-308X(08)00602-7
15. Fitzpatrick R. The strange case of the transfer of training estimate. *Ind. Organ. Psychol.*, 2001, vol. 39, no. 2, pp. 18–19.
16. Gleason T.H., Hamlin W.B. Disseminated toxoplasmosis in the compromised host: a report of five cases. *Arch. Intern. Med.*, 1974, vol. 134, no. 6, pp. 1059–1062.
17. Hassanzadeh M., Rasti S., Hooshyar H., Momen-Heravi M., Soliemani A., Mousavi S.G.A. Seroepidemiology of Toxoplasma gondii infection in immunodeficiency patients in Kashan and Qom during 2014–2015. *FEYZ*, 2017, vol. 21, no. 5, pp. 483–489.
18. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics. *Cancer J. Clin.*, 2011, vol. 61, no. 2, pp. 69–90. doi: 10.3322/caac.20107
19. Khabaz M.N., Elkhateeb L., Al-Alami J. Reactivation of latent Toxoplasma gondii in immunocompromised cancer patients. *Comp. Clin. Pathol.*, 2011, vol. 20, no. 2, pp. 183–186. doi: 10.1007/s00580-010-0975-8
20. Klastersky J., Aoun M. Opportunistic infections in patients with cancer *Ann. Oncol.*, 2004, vol. 15, no. 4, pp. iv329–iv335. doi: 10.1093/annonc/mdh947
21. Kusne S., Dummer J.S., Ho M., Whiteside T., Rabin B.S., Makowka L., Esquivel C.O., Starzl T.E. Self-limited Toxoplasma parasitemia after liver transplantation. *Transplantation*, 1987, vol. 44, no. 3, pp. 457–458.
22. Liu Q., Wang Z.-D., Huang S.-Y., Zhu X.-Q. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of Toxoplasma gondii. *Parasites Vectors*, 2015, vol. 8, no. 1: 292. doi: 10.1186/s13071-015-0902-6
23. Mechain B., Garin Y.J.F., Robert-Gangneux F., Dupouy-Camet J., Derouin F. Lack of utility of specific immunoglobulin G antibody avidity for serodiagnosis of reactivated toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2000, vol. 7, no. 4, pp. 703–705. doi: 10.1128/CDLI.7.4.703-705.2000
24. Pradhan S., Yadav R., Mishra V.N. Toxoplasma meningoencephalitis in HIV-seronegative patients: clinical patterns, imaging features and treatment outcome. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2007, vol. 101, no. 1, pp. 25–33. doi: 10.1016/j.trstmh.2006.02.021
25. Roozbehani M., Falak R., Mohammadi M., Hemphill A., Razmjou E., Meamar A.R., Masoori L., Khoshmirsafa M., Moradi M., Gharavi M.J. Characterization of a multi-epitope peptide with selective MHC-binding capabilities encapsulated in PLGA nanoparticles as a novel vaccine candidate against Toxoplasma gondii infection. *Vaccine*, 2018, vol. 36, no. 41, pp. 1624–1632. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.08.068
26. Rouatbi M., Amairia S., Amdouni Y., Boussaadoun M.A., Ayadi O., Al-Hosary A.A.T., Rekik M., Ben Abdallah R., Aoun K., Darghouth M.A., Wieland B., Gharbi M. Toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis in North Africa: a review. *Parasite*, 2019, vol. 26. doi: 10.1051/parasite/2019006
27. Safarpour H., Cevik M., Zarean M., Barac A., Hatam-Nahavandi K., Rahimi M.T., Bannazadeh Baghi H., Koshki T.J., Pagheh A.S., Shahrivar F., Ebrahimi M., Ahmadpour E. Global status of Toxoplasma gondii infection and associated risk factors in people living with HIV. *AIDS*, 2020, vol. 34, no. 3, pp. 469–474. doi: 10.1097/QAD.0000000000002424
28. Sasai M., Pradipta A., Yamamoto M. Host immune responses to Toxoplasma gondii. *Int. Immunol.*, 2018, vol. 30, no. 3, pp. 113–139. doi: 10.1093/intimm/dxy004
29. Sharif M., Daryani A., Ebrahimnejad Z., Gholami S., Ahmadpour E., Borhani S., Lamsechi N. Seroprevalence of anti-Toxoplasma IgG and IgM among individuals who were referred to medical laboratories in Mazandaran province, northern Iran. *J. Infect. Public Health*, 2016, vol. 9, no. 1, pp. 75–80. doi: 10.1016/j.jiph.2015.06.006
30. Verma N., Tyagi A., Singh P., Tyagi M., Rathi M., Sharma S. Incidence of bone tumors and tumor like lesions at a tertiary centre — a study of 64 cases. *J. Res. Med. Sci.*, 2018, vol. 6, no. 2, pp. 533. doi: 10.18203/2320-6012.ijrms20180293

31. Wang Z.-D., Liu H.-H., Ma Z.-X., Ma H.-Y., Li Z.-Y., Yang Z.-B., Zhu X.Q., Xu B., Wei F., Liu Q. Toxoplasma gondii infection in immunocompromised patients: a systematic review and meta-analysis. *Front. Microbiol.*, 2017, vol. 8: 389. doi: 10.3389/fmicb.2017.00389
32. Yuan Z., Gao S., Liu Q., Xia X., Liu X., Liu B., Hu R. Toxoplasma gondii antibodies in cancer patients. *Cancer Lett.*, 2007, vol. 254, no. 1, pp. 71–74. doi: 10.1016/j.canlet.2007.02.011

---

**Авторы:**

**Хаджизаде М.**, аспирант (медицинская паразитология) кафедры паразитологии и микологии, Школа медицины Иранского университета медицинских наук, г. Тегеран, Иран;  
**Фалак Р.**, доцент кафедры медицинской иммунологии, Школа медицины Иранского университета медицинских наук, г. Тегеран, Иран;  
**Таваколи-Яраки М.**, к.н., доцент кафедры биохимии, Школа медицины Иранского университета медицинских наук, г. Тегеран, Иран;  
**Хоссейнзаде Р.**, магистр медицинской паразитологии, кафедра медицинской иммунологии, Школа медицины Иранского университета медицинских наук, г. Тегеран, Иран;  
**Алипур М.**, студент кафедры паразитологии и микологии, Школа медицины Иранского университета медицинских наук, г. Тегеран, Иран;  
**Ахмадпур Э.**, Табризский университет медицинских наук, г. Табриз, Иран;  
**Рафиеи-Сефиддашти Р.**, доцент кафедры паразитологии и микологии, Школа медицины Иранского университета медицинских наук, г. Тегеран, Иран.

**Authors:**

**Hajizadeh M.**, PhD Student (Medical Parasitology), Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;  
**Falak R.**, Associate Professor, Department of Medical Immunology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;  
**Tavakoli-Yaraki M.**, MSc, PhD, Associate Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;  
**Hosseinzadeh R.**, MSc (Medical Parasitology), Department of Medical Immunology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;  
**Alipour M.**, Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;  
**Ahmadpour E.**, Infectious and Tropical Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran;  
**Rafiei-Sefiddashti R.**, Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

# COMPARISON OF THE PERCENTAGE OF NRBC/100 WBC IN EARLY ONSET SEPSIS AND NON-INFECTIOUS PREMATURE INFANTS

H. Boskabadi<sup>a</sup>, M.H. Sadeghian<sup>a</sup>, B. Mashkani<sup>a</sup>, M. Zakerihamidi<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>b</sup> Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

**Abstract.** *Introduction.* In spite of significant advances in medical care, neonatal sepsis remains an important risk factor for neonatal morbidity and mortality. Accordingly, the present study was conducted to compare the number of nucleated red blood cells per 100 white blood cells (NRBC/100WBC) in neonates with early onset sepsis and non-infectious neonates. *Materials and methods.* In this cross-sectional study of 154 neonates admitted to the NICU of Ghaem Hospital in Mashhad, Iran within the first three days of life, during 2014 to 2018, the characteristics of 44 neonates identified early onset sepsis (Case group) were compared with 110 non-infectious neonates (Control group). After the confirmation of sepsis in neonates based on positive blood culture and laboratory results, a researcher-made questionnaire containing neonatal characteristics (gestational age, weight, first minute Apgar scores, fifth minute Apgar score, duration of oxygen therapy, and mechanical ventilation duration) and neonatal laboratory profiles (routine blood culture, WBC, NRBC/100WBC, CRP, blood glucose, calcium and venous blood gas) was filled in. *Results.* The results of this study showed that the absolute number of NRBC/mm<sup>3</sup> in control group was 56.07±86.65 and in case group was 592.70±1166.75 (p = 0.000). Also, the number of NRBC per 100 white blood cells in control group was 6.54±11.18 and in case group was 31.84±40.07 (p = 0.000). The absolute number of NRBC/mm<sup>3</sup> for the detection of early onset sepsis had a good sensitivity (78%) and NRBC/100WBC was suitable specificity (68.2%). *Conclusion.* This study indicated that NRBC/100 WBC and absolute NRBC count/mm<sup>3</sup> can be helpful in the diagnosis of early onset sepsis and have an acceptable sensitivity and specificity.

**Key words:** early onset sepsis, nucleated red blood cells (NRBC), neonates, blood culture, infection, prematurity.

## СРАВНЕНИЕ ВЕЛИЧИН ОТНОШЕНИЯ «ЯДРОСОДЕРЖАЩИЕ ЭРИТРОЦИТЫ/100 ЛЕЙКОЦИТОВ» (NRBC/100 WBC) У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С РАННИМ РАЗВИТИЕМ СЕПСИСА И БЕЗ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ

Боскабади Х.<sup>1</sup>, Садегхиан М.Х.<sup>1</sup>, Машкани Б.<sup>1</sup>, Закерихамиди М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Мешхедский университет медицинских наук, г. Мешхед, Иран

<sup>2</sup> Исламский университет Азад, филиал Тонкабон, г. Тонкабон, Иран

**Резюме.** *Введение.* Несмотря на значительный прогресс в области оказания медицинской помощи, неонатальный сепсис остается важным фактором риска неонатальной заболеваемости и смертности. Настоящее исследование было проведено для сравнения величин отношения ядросодержащих эритроцитов к 100 лейкоцитам (NRBC/100WBC) у недоношенных новорожденных с ранним началом сепсиса и без инфекционной патологии. *Материалы и методы.* В поперечное исследование было включено 154 новорожденных, поступив-

### Адрес для переписки:

Закерихамиди Марьям  
Исламский университет Азад, филиал в Тонкабоне,  
г. Тонкабон, Иран.  
Тел.: +98 0115 427-11-05.  
E-mail: maryamzakerihamidi@yahoo.co.nz

### Contacts:

Maryam Zakerihamidi  
Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran.  
Phone: +98 0115 427-11-05.  
E-mail: maryamzakerihamidi@yahoo.co.nz

### Для цитирования:

Боскабади Х., Садегхиан М.Х., Машкани Б., Закерихамиди М. Сравнение величин отношения «ядросодержащие эритроциты/100 лейкоцитов» (NRBC/100 WBC) у недоношенных новорожденных с ранним развитием сепсиса и без инфекционной патологии // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1089–1094. doi: 10.15789/2220-7619-COT-1588

### Citation:

Boskabadi H., Sadeghian M.H., Mashkani B., Zakerihamidi M. Comparison of the percentage of NRBC/100 WBC in early onset sepsis and non-infectious premature infants // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1089–1094. doi: 10.15789/2220-7619-COT-1588

ших в отделение интенсивной терапии больницы Гаем в Мешхеде, Иран, в течение первых трех дней жизни в период с 2014 по 2018 г. У 44 новорожденных обнаружены признаки раннего сепсиса (группа сепсиса), 110 новорожденными не имели инфекционной патологии (контрольная группа). После подтверждения сепсиса на основании положительных результатов посева крови и лабораторных исследований, проанализировали составленный нами вопросник, содержащий характеристики новорожденных (гестационный возраст, вес, оценка по шкале Апгар на первой минуте, оценка по шкале Апгар на пятой минуте, продолжительность кислородной терапии и продолжительность искусственной вентиляции легких) и неонатальные лабораторные профили (образцы пуповинной крови, общий анализ крови, абсолютное количество ядросодержащих эритроцитов в  $\text{мм}^3$  (NRBC/ $\text{мм}^3$ ), отношение количества ядросодержащих эритроцитов к 100 лейкоцитам (NRBC/100WBC), С-реактивный белок). *Результаты* исследования показали, что абсолютное количество NRBC в контрольной группе составляло  $56,07 \pm 86,65/\text{мм}^3$ , а в группе сепсиса —  $592,70 \pm 1166,75/\text{мм}^3$  ( $p = 0,000$ ). Кроме того, количество NRBC на 100 лейкоцитов в контрольной группе составляло  $6,54 \pm 11,18$ , а в группе сепсиса —  $31,84 \pm 40,07$  ( $p = 0,000$ ). Метод определения абсолютного количества NRBC/ $\text{мм}^3$  показал хорошую чувствительность (78%), а подсчет соотношения NRBC/100WBC — неплохую специфичность (68,2%) для выявления раннего начала сепсиса. *Заключение.* Отношение NRBC/100WBC и абсолютное количество NRBC/ $\text{мм}^3$  могут быть полезны в диагностике сепсиса у недоношенных новорожденных и демонстрируют приемлемую чувствительность и специфичность.

**Ключевые слова:** ранний сепсис, ядросодержащие эритроциты (NRBC), новорожденные, гемокультура, инфекция, недоношенность.

## Introduction

Neonatal sepsis is a major cause of neonatal mortality. Therefore, rapid and timely identification of infected neonates is crucial in proper management of these patients [6]. Sepsis and infection are reported as the first (80%) and fourth (25.3%) most common cause of neonatal deaths. Early identification of neonatal sepsis increases the chance of neonates' recovery and reduces their complications [6]. In general, the diagnosis of infections in neonates is challenging due to non-specific symptoms as well as the absence of a definitive diagnostic test [4]. Neonatal clinical symptoms such as poor feeding, lethargy, bradycardia, hypothermia, hypotension, seizure, respiratory distress, etc. are non-specific for diagnosis of neonatal sepsis. Body fluids culture (blood and cerebrospinal fluid) is the gold standard for the diagnosis of neonatal infections, however, it takes 48–72 hours for the results to be available. Laboratory findings including complete blood cell count and laboratory and immunological tests have lower sensitivity and specificity than blood culture [4, 5, 6]. Nucleated red blood cells are, in fact, premature erythrocytes in the peripheral blood, leading to an increase in the peripheral blood in response to increased erythropoietin. Erythropoietin is a glycoprotein hormone secreted by the kidneys, liver, spleen, lungs, and bone marrow in response to hypoxemia [8]. Many acute and chronic stimuli increase the number of NRBC in blood circulation by increasing the activity of erythropoietin [14]. Dulay et al. (2008) examined the number of NRBC in neonates with early onset sepsis delivered at earlier gestational ages (mean  $\pm$  SD:  $27.1 \pm 2.8$  weeks) and found that it increased, and 83.9% of cases of early onset sepsis were confirmed and 48.9% of suspicious cases significantly increased [10].

Increasing the number of NRBCs in embryonic circulation may be secondary to hypoxia or inflammation [20]. Previous studies have shown that the inflammatory response associated with the release of cytokines, especially IL-6, can be led to an increase in the production of NRBC [23]. Both fetus inflammatory response and stress may play a role in the production or release of NRBC in the peripheral circulation. In addition, in pregnancies with histologic chorioamnionitis, host inflammatory response may be independent of erythropoietin resulting in increased fetal NRBC [21]. In one study, NRBC count in the peripheral blood smear helps with the diagnosis of neonatal infection and can be used in conjunction with other laboratory tests as a simple and convenient method [7].

As the number of nucleated red blood cells is one of the simple, available, and fast response factors, it can play an important role in facilitating the diagnosis of sepsis if it helps in early detection of the infection. Therefore, a case-control study was designed to evaluate the number of nucleated red blood cells in preterm neonates with early onset sepsis and compare them with non-infected neonates.

## Materials and methods

The study protocol was approved by the Ethics Committee of Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. This cross-sectional study (from 2013 to 2019) was performed on 154 neonates hospitalized in the first three days after birth, in Ghaem Hospital, Mashhad, Iran, using convenient sampling method. Ghaem Hospital is a general referral hospital with NICU (12 beds), level 2 care (25 beds) and a maternity hospital (Level 1 care), which has about 3000 births annually. The written informed consent was obtained from the parents of the neonates. Neonates

with Apgar scores less than 7 at 5 minutes after birth, congenital malformations, congenital TORCH infections, hemolytic anemia, and erythroblastosis fetalis were excluded from the study.

All the neonates entered the NICU in the first day of life were examined. Clinical and laboratory evaluation of patients was performed based on clinical examination guidelines. Data was extracted from neonatal medical history including gestational age, weight, 1 min Apgar score, fifth-minute Apgar score, duration of oxygen therapy and duration of mechanical ventilation) and neonatal laboratory characteristics (such as routine blood culture (Trypticase soy broth), WBC, NRBC/100WBC, CRP, blood glucose, calcium and Venous blood gas). The blood sample with EDTA, collected for the routine tests, was used for complete cell count, followed by peripheral blood smear analysis (by Giemsa staining). The cells were separated and the number of nucleated red blood cells (NRBCs) per 100 white blood cells was reported. Neonates who had a positive blood culture were considered as the case group. Early onset sepsis was considered based on its onset at 0 to 3 days of age. The neonates who had a negative blood culture and had no clinical and laboratory evidence of infection were considered as control group. The NRBC/100WBC and the number of absolute NRBC were compared between these two groups. SPSS version 23 was used to analyze the data. Statistical comparisons were performed by Mann–Whitney test, unpaired t-test and Chi-square test as required. Receiver-operating characteristic (ROC) curves were also constructed allowing the calculation of positive and negative predictive values. Analysis of covariance was used to control the variable of gestational age. A p-value  $\leq 0.05$  was considered as the cutoff for significant difference between groups.

## Results

A total of 286 infants were enrolled in the study; 31 were diagnosed with significant asphyxia, 26 with intrauterine growth retardation, 11 with congenital anomaly or infection, 6 with hemolytic anemia, 6 with maternal preeclampsia and 18 had maternal diabetes. Finally 22 neonates died in the 1<sup>st</sup> week and 12 with incomplete follow-up and were excluded from the study. The reported germs included: 12 cases of *Klebsiella pneumoniae* (27.27%), 10 cases of *Enterobacter* (22.72%), 10 cases of *Staphylococcus epidermidis* (22.7%), 6 cases of *E. coli* (13.63%), 4 cases of *Acinetobacter* (9.09%), and 2 cases of coagulase-negative *Staphylococci* (4.54%). Laboratory findings are summarized in Table.

The results of this study demonstrated that there was statistically significant difference in terms of the gestational age ( $p = 0.001$ ) between the two groups (neonates who had a negative blood culture and those who had a positive blood culture). However, after

adjusting for gestational age using the analysis of covariance, there was a statistically significant difference between the two groups in NRBC levels ( $p = 0.000$ ). There was a significant difference between two groups in CRP ( $p = 0.090$ ), WBC ( $p = 0.006$ ), NRBC/mm<sup>3</sup> ( $p = 0.000$ ), and NRBC/100 WBC ( $p = 0.000$ ). In other word, these variables in the neonatal group who had a positive blood culture were significantly higher than those of non-infected neonates (Table).

The results of this study showed that the number of NRBC/100 WBC and absolute number of NRBC/mm<sup>3</sup> increased in neonates with early onset sepsis. In the diagnosis of neonatal sepsis, the number of NRBC/100 WBC greater than 5 had a sensitivity of 72% and the specificity of 58%, and the absolute NRBC count greater than 400/mm<sup>3</sup> had sensitivity of 84.6% and specificity of 64% (Figure).

## Discussion

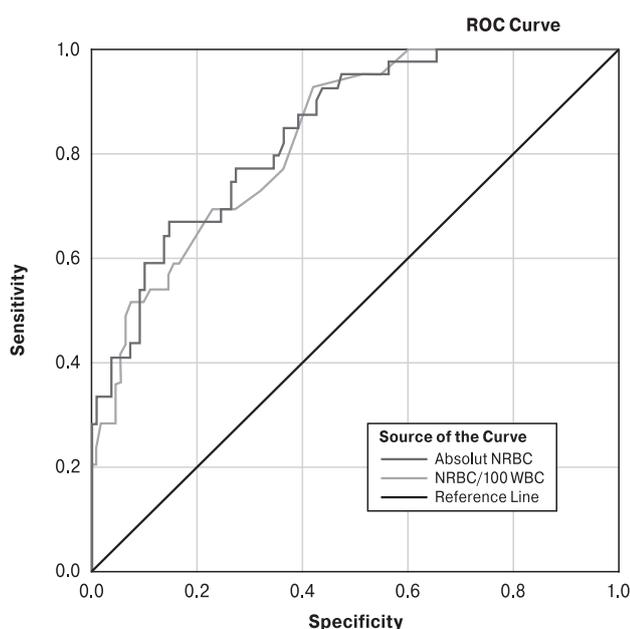
Early onset sepsis microorganisms are commonly encountered in the genitourinary tract of mother and cause the infection of the amniotic fluid, placenta, cervical or vaginal canal. In the event of a rupture of the membrane or before labor begins, the infection occurs in the amniotic fluid [4, 22]. The main causes of neonatal sepsis in advanced countries are *Streptococcus* group B, *E. coli* and *Listeria monocytogenes*, and in developing countries are gram-negative bacilli, coagulase negative *Staphylococci* and other bacteria [16]. In the present study, the most common causes of early onset sepsis were *Klebsiella* (25%), *Enterobacter* (22.7%), *Staphylococcus epidermidis* (22.7%) and *E. coli* (11.35%). In a study conducted by Farhat et al. (2014), the most common bacteria in neonatal sepsis in blood culture were coagulase negative *Staphylococcus* (35%), followed by *Staphylococcus aureus* (24%) and *Klebsiella* (18%) [11]. In a previous study, the most common bacteria in neonatal sepsis were gram-negative bacteria (55%) and coagulase negative *Staphylococcus* (34%) and other gram-positive bacteria (10%) [3]. In a similar another study in this center, 44% of the isolated microorganisms were coagulase negative *Staphylococcus*, followed by *Klebsiella pneumoniae* (31%), *E. coli* (19%), and other gram-negative microorganism (6%) [18]. The difference in the prevalence rate of microorganisms might be due to difference in sampling as well as that we studied only the early onset sepsis.

In this study, the number of WBCs in the neonatal group who had a positive blood culture was higher than that of non-infected neonates. The results of Hornik et al. (2012) showed that the number of WBC had a low correlation with early onset sepsis. The specificity of the WBC less than 5000 per mm<sup>3</sup> and the WBC count below 1000 per mm<sup>3</sup> to detect sepsis was high, but with low sensitivity [15].

**Table. Comparison of the mean neonatal variables between case and control groups**

Variables	Control group 110 [71.4%]	Case group 44 [28.6%]	p value
CRP (Mg/dl)	8.94±16.11	23.90±28.49	0.090
WBC	9.64±5.79	14.82±11.64	0.006
NRBC absolute count (mm <sup>3</sup> )	56.07±86.65	592.70±1166.75	0.000
NRBC/100 WBC	6.54±11.18	31.84±40.07	0.000
Neutrophil percentage	45.07±41.61	44.32±21.36	0.867
Lymphocyte percentage	47.51±18.27	44.18±21.13	0.113
Platelet (per mL)	250.48±157.73	172.70±106.60	0.845
1 min Apgar score	7.03±1.72	5.93±1.81	0.541
Fifth minute Apgar score	8.00±1.32	7.53±1.06	0.566
Weight (g)	1641.04±660.03	1350.22±606.23	0.382
Duration of oxygen therapy (day)	3.35±7.14	6.68±7.99	0.052
PT	15.16±3.01	19.39±4.67	0.319
PTT	74.50±29.99	63.00±28.88	0.643
Urea (mg/dl)	48.24±32.93	67.85±28.89	0.071
BUN (mg/dl)	60.09±20.20	39.00±13.06	0.077
Cr (mg/dl)	1.05±1.52	0.70±0.23	0.340
Sodium (mg/dl)	139.76±4.15	134.32±18.85	0.052
Calcium (mg/dl)	9.07±0.99	8.55±11.36	0.073
Blood glucose(mg/dl)	78.00±11.58	92.00±14.98	0.074
Ph1	7.29±0.14	7.28±0.12	0.858
be	7.71±0.79	7.17±0.92	0.974
Hco3a	21.31±4.32	22.74±4.48	0.316
Pco2a	43.08±18.62	48.46±10.91	0.324
HCT	41.45±7.55	43.57±7.08	0.135
Gestational age (wk)	30.23±3.10	32.85±3.90	0.001

Note. The values are based on standard deviation±mean.



**Figure. Comparison of the sensitivity and specificity of NRBC numbers in 100WBC and NRBC absolute count in the diagnosis of neonatal sepsis**

The results of the current study showed that in the confirmed early onset sepsis, the number of NRBC/100 WBC was about 5 times greater than non-infected neonates, and the absolute number of NRBC/mm<sup>3</sup> was nearly ten times greater than non-infected neonates. During the first 12 hours, the number of NRBCs decreased by 50% and reached 20 to 30 in mm<sup>3</sup> in the first 48 hours. In a healthy term neonate after 3 to 4 days, NRBC was not normally seen in the peripheral blood. However, preterm neonates may have NRBC in the peripheral blood up to one week after birth [2, 9, 12]. A similar showed that inflammatory response is associate with release of cytokines and the increase of NRBC [23]. Ranganathan reported the increase NRBC in the blood to be associated with an increased risk of early onset sepsis [19]. In a study by Dulay et al., who studied 68 preterm neonates, NRBCs and other inflammatory factors in the diagnosis of early onset sepsis were compared and a direct relationship between NRBC and IL-6 was reported in the diagnosis of neonatal sepsis [10]. Leikin et al. performed a study on 359 neonates of the mothers with chorioamnionitis, and found that there was a significant correlation between NRBC and pathological chorioamnionitis [17].

In the diagnosis of neonatal sepsis, NRBC/100 WBC more than 5 had the sensitivity of 72% and specificity of 58%, and the absolute number of NRBC greater than 400 had a sensitivity of 84.6% and specificity of 64%. In a study conducted by Abhishek and Sanjay, number of NRBCs was increased in all 14 neonates and had a sensitivity of 35% and a specificity of 53.48% to detect sepsis [1]. In a similar study, sensitivity and specificity of NRBC count more than 10 were reported as 45% and 83% to detect infection [7]. Therefore, this simple, fast, and cost-effective test can be used to identify early onset sepsis and reduce the mortality and morbidity of the neonates.

One of the limitations of our study was the selection of the group of premature infants without infection. Premature infants often have different morbidities and it is difficult to find healthy premature neonates. Also, convenient sample size and thereby overlapping confidence intervals were other limitations of our study.

## References

1. Abhishek M., Sanjay M. Diagnostic efficacy of nucleated red blood cell count in the early diagnosis of neonatal sepsis. *Indian J. Pathol. Oncol.*, 2015, vol. 2, no. 4, pp. 182–185.
2. Axt R., Ertan K., Hendrik J., Wrobel M., Mink D., Schmidt W. Nucleated red blood cells in cord blood of singleton term and post-term neonates. *J. Perinat. Med.*, 1999, vol. 27, no. 5, pp. 376–381. doi: 10.1515/JPM.1999.051
3. Boskabadi H., Maamouri G., Akhodian J., Zakerihamidi M., Sayedi S.J., Ghazvini K., Ali Kiani M., Boskabadi A., Reyhani T., Karbandi S., Vashani H.B., Razaghi N., Mollaei M.K., Parvini Z., Skandari T., Rezaeian A., Bagheri F. Neonatal infections: a 5-year analysis in a neonatal care unit in North East of Iran. *Int. J. Pediatr.*, 2016, vol. 4, no. 36, pp. 3989–3998. doi: 10.22038/IJP.2016.7893
4. Boskabadi H., Maamouri G., Mafinejad S. Neonatal complications related with prolonged rupture of membranes. *Open Access Maced. J. Med. Sci.*, 2011, vol. 4, no. 1, pp. 93–98. doi: 10.3889/MJMS.1857-5773.2011.0159
5. Boskabadi H., Maamouri G., Tavakol Afshari J., Mafinejad S., Hosseini G., Mostafavi-Toroghi H., Saber H., Ghayour-Mobarhan M., Ferns G. Evaluation of serum interleukins-6, 8 and 10 levels as diagnostic markers of neonatal infection and possibility of mortality. *Iran J. Basic Med. Sci.*, 2013, vol. 16, no. 12, pp. 1232–1237.
6. Boskabadi H., Moudi A., Parvini Z., Barati T. Evaluation of the cause and related factors of neonatal mortality in Qaem hospital 1388–1389. *Iran J. Obstet. Gynecol. Infertil.*, 2012, vol. 14, no. 7, pp. 21–26.
7. Boskabadi H., Sadeghian M.H. Investigation of changes in nucleated red blood cells in neonatal infection. *Iran J. Neonatol.*, 2017, vol. 8, no. 4, pp. 26–32. doi: 10.22038/ijn.2017.14811.1227
8. Boskabadi H., Zakerihamidi M., Sadeghian M.H., Avan A., Ghayour-Mobarhan M., Ferns G.A. Nucleated red blood cells count as a prognostic biomarker in predicting the complications of asphyxia in neonates. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 2017, vol. 30, no. 21, pp. 2551–2556. doi: 10.1080/14767058.2016.1256988
9. Buonocore G., Perrone S., Gioia D., Gatti M.G., Massafra C., Agosta R., Bracci R. Nucleated red blood cell count at birth as an index of perinatal brain damage. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1999, vol. 181, no. 6, pp. 1500–1505. doi: 10.1016/s0002-9378(99)70396-0
10. Dulay A.T., Buhimschi I.A., Zhao G., Luo G., Abdel-Razeq S., Cackovic M., Rosenberg V.A., Pettker C.M., Thung S.F., Bahtiyar M.O., Bhandari V., Buhimschi C.S. Nucleated red blood cells are a direct response to mediators of inflammation in newborns with early-onset neonatal sepsis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2008, vol. 198, no. 4, pp. 426.e1–426.e9. doi: 10.1016/j.ajog.2008.01.040
11. Farhat A.S., Mohammadzadeh A., Mirzaie F., Khademi G., Nasab M.N. Clinical manifestation and laboratory findings of positive blood culture in neonatal septicemia. *Iran J. Neonatol.*, 2014, vol. 5, no. 3, pp. 13–17. doi: 10.22038/IJN.2014.4143
12. Green D.W., Hendon B., Mimouni F.B. Nucleated erythrocytes and intraventricular hemorrhage in preterm neonates. *Pediatrics*, 1995, vol. 96, no. 3, pp. 475–478.
13. Haque K.N. Neonatal sepsis in the very low birth weight preterm infants: Part 1: Review of patho-physiology. *J. Med. Sci.*, 2010, vol. 3, no. 1, pp. 12–27. doi: 10.2174/1996327001003010001
14. Hermansen M. Nucleated red blood cells in the fetus and newborn. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.*, 2001, vol. 84, no. 3, pp. F211–F215. doi: 10.1136/fn.84.3.F211
15. Hornik C.P., Benjamin D.K., Becker K.C., Benjamin D.K. Jr, Li J., Clark R.H., Cohen-Wolkowicz M., Smith P.B. Use of the complete blood cell count in early-onset neonatal sepsis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2012, vol. 31, no. 8, pp. 799–802. doi: 10.1097/INF.0b013e318256905c
16. Klein J.O. Bacterial sepsis and meningitis. In: Infectious diseases of the fetus and newborn infant. Philadelphia: WB Saunders, 2000, pp. 943–998.
17. Leikin E., Garry D., Visintainer P., Verma U., Tejani N. Correlation of neonatal nucleated red blood cell counts in preterm infants with histologic chorioamnionitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1997, vol. 177, no. 1, pp. 27–30. doi: 10.1016/s0002-9378(97)70433-2

## Conclusion

In neonates with confirmed early onset sepsis, NRBC/100 WBC and the absolute number of NRBCs increased by about 5–10 times greater than non-infectious neonates. The NRBC number per 100 WBC greater than 5 had a suitable sensitivity and the absolute number of NRBC greater than 400 had high sensitivity to the diagnosis of early onset sepsis.

### “What This Study Adds”

The NRBC number per 100 WBC greater than 4 has a suitable sensitivity and the absolute number of NRBC greater than 400 had high sensitivity for the diagnosis of early onset sepsis.

### “What is Already Known”

Neonatal sepsis is a the major cause of neonatal mortality and rapid and timely identification of infected neonates plays an important role in the treatment of these patients.

18. Panah Y. Neonatal intensive care unit nosocomial bacterial infections. *Tehran University Med. J.*, 2008, vol. 66, no. 5, pp. 349–354.
19. Ranganathan D., Khoshnood B., Boonlayangoor S., Meadow W. Nucleated red blood cells (NRBCs): an unheralded marker of early-onset neonatal sepsis. *Pediatric Res.*, 1999, vol. 45. doi: 10.1203/00006450-199904020-01623
20. Ravishankar V., Buhimschi C.S., Booth C.J., Bhandari V., Norwitz E., Copel J., Buhimschi I.A. Fetal nucleated red blood cells in a rat model of intrauterine growth restriction induced by hypoxia and nitric oxide synthase inhibition. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2007, vol. 196, no. 5, pp. 482.e1–482.e8. doi: 10.1016/j.ajog.2006.12.020
21. Salafia C.M., Ghidini A., Pezzullo J.C., Rosenkrantz T.S. Early neonatal nucleated erythrocyte counts in preterm deliveries: clinical and pathologic correlations. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 1997, vol. 4, no. 3, pp. 138–143. doi: 10.1016/s1071-5576(97)00022-1
22. St Geme J.W. 3<sup>rd</sup>, Polin R.A. Neonatal sepsis. *Advances in pediatric infectious diseases. Drugs*, 1988, vol. 36, pp. 784–800. doi: 10.2165/00003495-198836060-00007
23. Stachon A., Bolulu O., Holland-Letz T., Krieg M. Association between nucleated red blood cells in blood and the levels of erythropoietin, interleukin 3, interleukin 6, and interleukin 12p70. *Shock*, 2005, vol. 24, no. 1, pp. 34–39. doi: 10.1097/01.shk.0000164693.11649.91

---

**Авторы:**

**Боскабади Х.**, профессор кафедры педиатрии, факультет медицины Мешхедского университета медицинских наук, г. Мешхед, Иран;

**Садегхиан М.Х.**, доцент кафедры гемопатологии, Больница Гаэм, Мешхедский университет медицинских наук, г. Мешхед, Иран;

**Машкани Б.**, доцент кафедры медицинской биохимии, Школа медицины Мешхедского университета медицинских наук, г. Мешхед, Иран;

**Закерихамиди М.**, кандидат наук (репродуктивное здоровье), доцент кафедры акушерства факультета медицинских наук Исламского университета Азад, филиал Тонкабон, г. Тонкабон, Иран.

**Authors:**

**Boskabadi H.**, Professor, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran;

**Sadeghian M.H.**, Associate Professor, Department of Hematopathology, Ghaem Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran;

**Mashkani B.**, Associate Professor, Department of Medical Biochemistry, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran;

**Zakerihamidi M.**, PhD (Reproductive Health), Assistant Professor of Reproductive Health, Department of Midwifery, Faculty of Medical Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran.

---

Поступила в редакцию 20.08.2020  
Принята к печати 27.03.2021

Received 20.08.2020  
Accepted 27.03.2021

# THE PROFILE OF LACTATE, ALBUMIN, AND LACTATE/ALBUMIN RATIO AS PREDICTORS OF MORTALITY IN SEPSIS PATIENTS

A. Iskandar<sup>a,c</sup>, M.I. Vincentia<sup>b</sup>, W. Jaya<sup>a,c</sup>, A. Aryati<sup>b,d</sup>, A. Pramadhani<sup>a</sup>, A. Aprilia<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

<sup>b</sup> Airlangga University, Surabaya, Indonesia

<sup>c</sup> Dr. Saiful Anwar General Hospital, Malang, Indonesia

<sup>d</sup> Dr. Soetomo General Hospital, Surabaya, Indonesia

**Abstract.** *Background.* Oxygenation disturbances in sepsis patients may cause lactate levels increase which is proportional to the severity of the inflammation, followed by decrease in albumin levels. Combination of these two parameters is expected to be predictor of mortality in patients with sepsis. The aim of this study is to investigate the profile of lactate, albumin, and lactate/albumin ratio as mortality predictors in patient with sepsis. *Methods.* This prospective cohort study was conducted in the ICU of dr. Saiful Anwar Hospital, Malang, from January to May 2019. Subjects were 82 patients with sepsis (SOFA score > 2). Lactate and albumin levels were measured on the first day of hospitalization. Lactate levels were examined by colorimetric method, albumin was examined by BCG method. The instrument used was Cobas 501. Comparison was carried out using the T-Test/Mann–Whitney test. Prediction of mortality risk was done using relative risk (RR) determination. *Results.* Significant difference was observed in albumin levels between sepsis patients who survived and who died ( $p = 0.045$ ). No significant differences were observed in lactate levels and lactate/albumin ratio between sepsis patients who survived and who died ( $p = 0.211, 0.119$ , respectively). Relative risks were 3.034 for lactate, 3.667 for albumin, and 4.400 for lactate/albumin ratio. *Conclusion.* In patients with sepsis, albumin level is the best variable in predicting mortality, followed by lactate/albumin ratio and lactate value. Further study that implements repeated measurement of lactate and albumin in 6 and 12 hours is required to better predict the mortality of sepsis patients.

**Key words:** lactate, albumin, lactate/albumin ratio, mortality, sepsis, prognosis.

## УРОВЕНЬ ЛАКТАТА, АЛЬБУМИНА И ОТНОШЕНИЕ «ЛАКТАТ/АЛЬБУМИН» КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ СМЕРТНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ

Искандар А.<sup>1,3</sup>, Винсентиа М.И.<sup>2</sup>, Джая В.<sup>1,3</sup>, Арияти А.<sup>2,4</sup>, Прамадхани А.<sup>1</sup>, Априлиа А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Университет Бравиджая, г. Маланг, Индонезия

<sup>2</sup> Университет Эйрланга, г. Сурабая, Индонезия

<sup>3</sup> Больница общего профиля им. д-ра Сайфула Анвара, г. Маланг, Индонезия

<sup>4</sup> Больница общего профиля им. д-ра Соэтото, г. Сурабая, Индонезия

**Резюме.** *Актуальность.* Нарушения оксигенации у пациентов с сепсисом могут вызывать повышение уровня лактата пропорционально тяжести воспаления с последующим снижением уровня альбумина. Пред-

---

### Адрес для переписки:

Андреа Априлиа  
65145, Индонезия, Восточная Ява, г. Маланг, Ловоквару,  
ул. Ветеран, Университет Бравиджая.  
Тел.: +62 (8577) 400-90-60.  
E-mail: andreaaprilial34@gmail.com

### Contacts:

Andrea Aprilia  
65145, Indonesia, East Java, Malang, Lowokwaru, Veteran str.,  
Universitas Brawijaya.  
Phone: +62 (8577) 400-90-60.  
E-mail: andreaaprilial34@gmail.com

---

### Для цитирования:

Искандар А., Винсентиа М.И., Джая В., Арияти А., Прамадхани А.,  
Априлиа А. Уровень лактата, альбумина и отношение «лактат/  
альбумин» как прогностические маркеры смертности у пациентов  
с сепсисом // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1095–1100.  
doi: 10.15789/2220-7619-POL-1691

### Citation:

Iskandar A., Vincentia M.I., Jaya W., Aryati A., Pramadhani A., Aprilia A.  
The profile of lactate, albumin, and lactate/albumin ratio as predictors  
of mortality in sepsis patients // Russian Journal of Infection and  
Immunity = Infeksiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1095–1100.  
doi: 10.15789/2220-7619-POL-1691

полагается, что сочетание этих двух параметров может служить предиктором смертности у пациентов с сепсисом. Целью данного исследования являлось изучение уровня лактата, альбумина и соотношения «лактат/альбумин» как предикторов смертности у пациентов с сепсисом. *Методы.* Настоящее проспективное когортное исследование было проведено в отделении интенсивной терапии Больницы им. д-ра Сайфула Анвара, Маланг, с января по май 2019 г. Испытуемые — 82 пациента с сепсисом (оценка SOFA > 2). Уровни лактата и альбумина измеряли в первый день госпитализации. Уровень лактата определяли колориметрическим методом, уровень альбумина — методом БЦЖ на приборе Cobas 501. Сравнение проводилось с использованием t-теста Стьюдента/теста Манна–Уитни. Прогнозирование риска смертности производилось с использованием определения относительного риска (ОР). *Результаты.* Достоверная разница наблюдалась в уровнях альбумина у выживших и умерших пациентов с сепсисом ( $p = 0,045$ ), без значительных различий в уровнях лактата и соотношении «лактат/альбумин» у выживших и умерших пациентов с сепсисом ( $p = 0,211$  и  $0,119$  соответственно). Относительные риски составили 3,034 для лактата, 3,667 для альбумина и 4,400 для соотношения «лактат/альбумин». *Выводы.* У пациентов с сепсисом уровень альбумина является лучшим параметром для прогнозирования смертности, за ним следует соотношение «лактат/альбумин» и уровень лактата. Для более точного прогнозирования смертности пациентов с сепсисом требуется дальнейшее исследование, в котором следует повторно провести измерение лактата и альбумина через 6 и 12 часов.

*Ключевые слова:* лактат, альбумин, соотношение «лактат/альбумин», смертность, сепсис, прогноз.

## Introduction

Sepsis is a life-threatening organ dysfunction caused by an unregulated host response to infection [14]. Sepsis, including severe sepsis and septic shock, is a major health problem and one of the leading causes of death. It is estimated that sepsis occurs in 30 million people worldwide each year and has the potential to cause 6 million deaths. The mortality rate due to sepsis is approximately 6% of all causes of death in hospital. Given the high mortality rate, it is important to determine the prognosis in septic patients, to determine subsequent management [7]. Therefore, it is necessary to develop biomarkers that can be used as predictors of mortality in septic patients.

Several studies have shown that lactate levels are a reliable parameter in predicting prognosis in septic patients [7]. Lactate levels may increase in septic patients through several mechanisms [4]. Low peripheral oxygenation in septic patients leads to anaerobic glycolysis which leads to lactate production. In clinical practice, lactate levels are commonly used to detect tissue hypoxia. However, elevated lactate levels seem to reflect more than just tissue hypoxia. Hyperlactatemia is also found in septic patients with normal tissue oxygenation who experience excessive  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  stimulation, where activation of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  will cause release of lactate from muscle tissue [7]. Mitochondrial insufficiency in metabolizing pyruvate caused by stress can also cause an increase in lactate in septic patients [4]. However, the source, clearance and metabolic function of lactate in sepsis are still not well known [1].

Other than elevated lactate, a study by Magnussen et al. showed that in septic patients, there was a de-

crease in albumin [8]. Albumin is an acute phase protein produced in the liver [7]. Decreased albumin levels have been linked to various chronic conditions such as liver failure, malnutrition, or enteropathy. However, studies in critically ill patients have shown that albumin levels are more of an indicator of inflammation reflecting the severity of inflammation rather than a marker of nutritional status [7, 8]. This supports the suggestion that albumin may serve as an additional parameter as predictors of mortality and prognosis in septic patients [7].

Both lactate and albumin are parameters that can independently predict mortality. The combination of the two is expected to increase the predictive value of mortality in septic patients. The aim of this study is to determine the profile of lactate, albumin, and lactate/albumin ratio as predictors of mortality in septic patients.

## Materials and methods

This study was conducted in a prospective cohort study design. The research was conducted at the Intensive Care Unit (ICU) of Dr. Saiful Anwar General Hospital, Malang, from January to May 2019. The subjects involved in this study were 82 patients who were treated in ICU and met the criteria for sepsis (Sequential Organ Failure Assessment score/SOFA score > 2). Inclusion criteria in this study were age > 16 years, SOFA score > 2. While the exclusion criteria were patients who had received albumin therapy. The study was carried out after obtaining approval from the ethical committee of the Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya/Dr. Saiful Anwar General Hospital, Malang.

Lactate and albumin levels were checked from serum samples taken on the first day the patients were

admitted. Lactate levels were checked by colorimetric method using Cobas 501, expressed in mmol/L. While albumin levels were checked by colorimetric method bromocresol green (BCG) using Cobas 501, expressed in g/dL. The ratio of lactic acid/albumin was calculated from the results of the examination of lactate levels divided by albumin levels.

Statistical analysis was carried out using IBM SPSS Statistics 25 software. Comparison test was done using the T-test/Mann–Whitney test. P level < 0.05 considered as significance. The prediction of the risk of mortality was done by determining Relative Risk (RR), while the cut-off value was determined using previous research data.

## Results

There were 82 subjects participating in this study, 22 (26.8%) of them were discharged and 60 (73.2%) died. Complete lactate and albumin levels were only found in 58 subjects, which were then analyzed in this study. Of 58 subjects, 13 (22.4%) were discharged, and 45 (77.6%) died. All subjects undergone the albumin and lactate examinations once when admission. The characteristic of study subjects according to age and sex in the group of patients who were discharged and died are shown in the Table. Furthermore, the comparison test was carried out with the T-test/Mann–Whitney test, and the p-values were 0.025 and 0.065, respectively.

There was a significant difference in albumin levels between septic patients who were discharged and died with p levels of 0.045. There were no significant differences in lactate levels, as well as lactate/albumin ratio in septic patients who were discharged and died with p values of 0.211 and 0.119, respectively (Table).

The cut off value determined for lactate levels, albumin levels and lactate/albumin ratio variables were 4.00 mmol/L, 2.45 g/dL and 1.32, respectively. With this cut off value, the RR was 3.034 for lactate variable, 3.667 for albumin, and 4.400 for lactate/albumin ratio.

## Discussion

The results showed that the median of lactate levels in patients who died was higher than in patients who were discharged. Lactate levels in the group of patients who died were in the range of 1.60–8.20 mmol/L. Of the 13 patients who were discharged, 9 (69.2%) had high lactate levels (> 2 mmol/L). In contrast, of the 45 patients who died, 6 (13.3%) had normal lactate levels (< 2.0 mmol/L). These results correspond with the study conducted by Van Beest et al. that lactate level is higher in those patients who died rather than

those who discharged [6]. These results also correspond with the study conducted by Nichol et al. which showed that not only hyperlactatemia (> 2.0 mmol/L), but relative hyperlactatemia and lactate levels in the upper normal range, were also associated with increased mortality [11, 12].

Although the mean lactate level was higher in patients who died than in patients who were discharged, there was no significant difference between the two groups. These results can be explained as follows: 1) not every hyperlactatemia is associated with acidosis, which is an important contributor to poor prognosis [19]. Lactic acidosis is better at predicting mortality in patients with severe sepsis and septic shock, compared with hyperlactatemia. Acid-base status needs to be considered in predicting the prognosis of septic patients when using serum lactate levels [6]; 2) the mechanisms that cause hyperlactatemia may play an important role in predicting mortality, rather than the hyperlactatemia itself. Lactate levels depend not only on lactate production but also on its clearance. It is not known which mechanism is more important in the prediction of mortality [12, 19], study by Haas et al. demonstrated that severe hyperlactatemia correlates with ICU mortality, particularly if lactate clearance does not occur within 12 hours of admission [3]; 3) comorbidities, such as renal fail-

**Table. Lactate acid levels and lactate acid/albumin ratio in patients who survived and died**

Characteristics	Survived	Died	p value	RR*
<b>Amount of subjects</b>	13 (22.4%)	45 (77.6%)		
<b>Age (year old)</b>	45.85±16.58	56.75±14.50	0.025	
<b>Gender</b>				
<b>Male</b>	4 (12.9%)	27 (87.1%)	0.065	
<b>Female</b>	9 (33.3%)	18 (66.7%)		
<b>Lactate levels<sup>a</sup></b>				
<b>Median</b>	2.80	3.30	0.211	3.034
<b>&lt; 4 mmol/L</b>	11 (27.5%)	29 (72.5%)		
<b>≥ 4 mmol/L</b>	2 (11.1%)	16 (88.9%)		
<b>Albumin levels<sup>b</sup></b>				
<b>Mean±SD</b>	3.02±0.56	2.68±0.52	0.045	3.667
<b>Range</b>	2.68–3.36	2.53–2.84		
<b>≥ 2.45 g/dL</b>	11 (28.9%)	27 (71.1%)		
<b>&lt; 2.45 g/dL</b>	2 (10.0%)	18 (90.0%)		
<b>Lactate/albumin ratio</b>				
<b>Mean±SD</b>	1.01±0.59	1.35±0.70	0.119	4.400
<b>Range</b>	0.66–1.37	1.14–1.56		
<b>&lt; 1.32</b>	11 (30.6%)	25 (69.4%)		
<b>≥ 1.32</b>	2 (9.1%)	20 (90.9%)		

**Note.** \*RR — relative risk; SD — standard deviation. <sup>a</sup> — results in mmol/L, <sup>b</sup> — results in g/dL.

ure, may also have an additional role in the incidence of mortality [19].

However, the results of this study indicate that lactate levels  $> 4.0$  mmol/L have an RR value of 3.034 in predicting mortality in septic patients. These results are consistent with the study conducted by Thomas-Rueddel et al. which showed that at lactate levels of  $> 4.0$  mmol/L, an OR of 3.0 was obtained in predicting mortality 28 days after treatment in septic patients [18]. The study by Mikkelsen et al. also showed that moderate (2.0–3.9 mmol/L) and severe ( $> 4.0$  mmol/L) increase in lactate levels can predict mortality by 2.05–3.27 times and 4.87 times in patients with sepsis [9]. The study by Hasegawa et al. showed that an increase in lactate levels can predict mortality within 90 days in septic patients with Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) with an Odds Ratio (OR) of 2.31, but not in the group of septic patients without DIC.

Dynamic changes in lactate levels are better than single lactate assays in predicting outcome in critically ill patients [11]. Normalization of lactate levels suggests an improvement in tissue oxygenation and aerobic metabolism [1, 19]. The study conducted by Nguyen et al. showed that high lactate clearance in septic patients occurring within the first 6 hours, has been shown to be associated with a reduction in 60-day mortality. Lactate clearance occurred in 38% of the patient group who survived. Whereas in the group of patients who died, lactate clearance was only obtained by 12% [10]. However, lactate clearance could not be assessed in this study because serial lactate levels were not examined.

Lower mean albumin levels were found in patients who died than in patients who were discharged, with a significant difference between the two groups. This result corresponds with studies by Gupta et al. and Takegawa et al. which showed that the mortality in patients with sepsis, severe sepsis, septic shock with hypoalbuminemia was higher than without hypoalbuminemia [2, 16]. The study by Yin et al. also showed that 28-day survival rate in patients with serum albumin  $< 2.92$  g/dL was lower than in patients with serum albumin  $> 2.92$  g/dL [21]. In ICU patients, serum albumin can be used as a clinical prognostic predictor, although its levels may also reflect an acute phase response. The decrease in albumin levels is in line with the increase in pulmonary vascular permeability, which may play a role in mortality. Decrease in albumin that occurs within 1–3 days has a higher mortality risk than the decrease in albumin that occurs within 7–14 days [16]. In addition to affecting vascular permeability, patients with low serum albumin levels are more likely to experience infection from abdominal/pelvic sources, acute kidney or liver damage, septic shock, and generally have a higher APACHE II and SOFA score [21].

The study by Qian et al. showed that the optimal cut off value of albumin which indicates a poor outcome is  $< 2.45$  g/dL, where the albumin level can predict both short and long term mortality in patients with septic shock [13]. The result corresponds with this study which showed that albumin levels ( $< 2.45$  g/dL) is a good predictor of mortality with a RR value of 3.667.

Kendall H. investigated baseline albumin levels at presentation, the trends in albumin decline and the lowest albumin levels in relation to predictors of mortality in septic patients. The results showed that the mortality rate in septic patients with initial albumin levels  $< 2.45$  g/dL was 63.4%. The mortality rate became 70.6% if there is a decrease in albumin levels. The lowest albumin level is the best predictor of mortality, compared to the initial albumin level and the decreasing trend in albumin [5]. The examination of serial albumin levels was not carried out in this study, so the trend of decreasing albumin and the lowest albumin levels cannot be evaluated.

There was a higher lactate/albumin ratio in patients who died than in patients who were discharged. However, there was no significant difference between the two groups. The optimal cutoff value of lactate/albumin ratio in the study conducted by Shin et al. was 1.32 [15]. In this study, the cut-off value could be used as a predictor of mortality in septic patients with an RR of 4.400. The study by Wang et al. showed similar results where the lactate/albumin ratio on the first day of admission was higher in the multiple organ dysfunction syndrome (MODS) patient group (median of 2.295) compared to the group of patients without MODS (median of 1.550). The lactate/albumin ratio can predict mortality with AUC of 0.84 [20]. These results also correspond with the study by Shin et al. and Thapa et al. which showed that lactate/albumin ratio can predict mortality within 28 days, with AUC of 0.69 and 0.90 [15, 17]. Lactate/albumin ratio is better than lactate levels in predicting mortality in septic patients [15], according to the study.

The results of this study indicate that the lactate/albumin ratio is the best predictor of mortality, followed by albumin levels and lactate levels. Limitations of this study include: 1) bias from the variation of therapy is an uncontrollable factor. For example, administration of epinephrine, metformin, nucleoside analog, high volume hemofiltration with lactate-buffered fluid, will cause an increase in lactate levels [12]; 2) comorbidity is also an uncontrollable factor in this study; 3) lactate and albumin examination was only performed once on the first day of admission so the normalization of lactate levels and the trend of decreasing albumin levels could not be evaluated.

In septic patients, the albumin level is the best predictor of mortality, followed by lactate/albumin

ratio and lactate level. Further study is needed with 6 and 12 hours of lactate and albumin serial examination, so that the prediction of mortality in septic patients can be better.

## Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

## Acknowledgements

We would like to thank the Ministry of Research and Higher Education and Rector of the Universitas Brawijaya for providing funding for this research. We also thank our colleagues from the Department of Anesthesiology and Intensive Therapy for collaboration.

## References

- Garcia-Alvarez M., Marik P., Bellomo R. Sepsis-associated hyperlactatemia. *Crit. Care*, 2014, vol. 18, no. 5: 503. doi: 10.1186/s13054-014-0503-3
- Gupta L., James B.S. Hypoalbuminemia as a prognostic factor in sepsis, severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.*, 2012, vol. 40: 727. doi: 10.1097/01.ccm.0000424942.33592.72
- Haas S.A., Lange T., Saugel B., Petzoldt M., Fuhrmann V., Metschke M., Kluge S. Severe hyperlactatemia, lactate clearance and mortality in unselected critically ill patients. *Intensive Care Med.*, 2016, vol. 42, no. 2, pp. 202–210. doi: 10.1007/s00134-015-4127-0
- Hasegawa D., Nishida K., Hara Y., Kawaji T., Moriyama K., Shimomura Y., Niimi D., Komura H., Nishida O. Differential effect of lactate in predicting mortality in septic patients with or without disseminated intravascular coagulation: a multicenter, retrospective, observational study. *J. Intens. Care.*, 2019, vol. 7: 2. doi: 10.1186/s40560-019-0389-x
- Kendall H., Abreu E., Cheng A.L. Serum albumin trend is a predictor of mortality in ICU patients with Sepsis. *Biol. Res. Nurs.*, 2019, vol. 21, no. 3, pp. 237–244. doi: 10.1177/1099800419827600
- Lee S.W., Hong Y., Park D., Choi S.H., Moon S., Park J.S., Kim J.Y., Baek K.J. Lactic acidosis not hyperlactatemia as a predictor of in-hospital mortality in septic emergency patients. *Emerg. Med. J.*, 2008, vol. 25, no. 10, pp. 659–665. doi: 10.1136/emj.2007.055558
- Lichtenauer M., Wernly B., Ohnewein B., Franz M., Kabisch B., Muessig J., Masyuk M., Lauten A., Schulze P.C., Hoppe U.C., Kelm M., Jung C. The lactate/albumin ratio: a valuable tool for risk stratification in septic patients admitted to ICU. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 9: 1893. doi: 10.3390/ijms18091893
- Magnussen B., Oren Gradel K., Gorm Jensen T., Kolmos H.J., Pedersen C., Just Vinholt P., Touborg Lassen A. Association between hypoalbuminaemia and mortality in patients with community-acquired bacteraemia is primarily related to acute disorders. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 9: e0160466. doi: 10.1371/journal.pone.0160466
- Mikkelsen M.E., Miltiades A.N., Gaieski D.F., Goyal M., Fuchs B.D., Shah C.V., Bellamy S.L., Christie J.D. Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. *Crit. Care Med.*, 2009, vol. 37, no. 5, pp. 1670–1677. doi: 10.1097/CCM.0b013e318199fc68
- Nguyen H.B., Rivers E.P., Knoblich B.P., Jacobsen G., Muzzin A., Ressler J.A., Tomlanovich M.C. Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.*, 2004, vol. 32, no. 8, pp. 1637–1642. doi: 10.1097/01.ccm.0000132904.35713.a7
- Nichol A., Bailey M., Egi M., Pettila V., French C., Stachowski E., Reade M.C., Cooper D.J., Bellomo R. Dynamic lactate indices as predictors of outcome in critically ill patients. *Crit. Care*, 2011, vol. 15, no. 5: R242. doi: 10.1186/cc10497
- Nichol A.D., Egi M., Pettila V., Bellomo R., French C., Hart G., Davies A., Stachowski E., Reade M.C., Bailey M., Cooper D.J. Relative hyperlactatemia and hospital mortality in critically ill patients: a retrospective multi-centre study. *Crit. Care*, 2010, vol. 14, no. 1: R25. doi: 10.1186/cc8888
- Qian S.-Z., Jin D., Chen Z.-B., Ye Y.-C., Xiang W.-W., Ye L.-M., Pan J.-Y. Hypoalbuminemia, a novel prognostic factor for prediction of long-term outcomes in critically ill patients with septic shock. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2019, vol. 12, no. 6, pp. 7401–7409.
- Rhodes A., Evans L.E., Alhazzani W., Levy M.M., Antonelli M., Ferrer R., Kumar A., Sevransky J.E., Sprung C.L., Nunnally M.E., Rochwerg B., Rubenfeld G.D., Angus D.C., Annane D., Beale R.J., Bellingham G.J., Bernard G.R., Chiche J.D., Coopersmith C., De Backer D.P., French C.J., Fujishima S., Gerlach H., Hidalgo J.L., Hollenberg S.M., Jones A.E., Karnad D.R., Kleinpell R.M., Koh Y., Lisboa T.C., Machado F.R., Marini J.J., Marshall J.C., Mazuski J.E., McIntyre L.A., McLean A.S., Mehta S., Moreno R.P., Myburgh J., Navalesi P., Nishida O., Osborn T.M., Perner A., Plunkett C.M., Ranieri M., Schorr C.A., Seckel M.A., Seymour C.W., Shieh L., Shukri K.A., Simpson S.Q., Singer M., Thompson B.T., Townsend S.R., Van der Poll T., Vincent J.L., Wiersinga W.J., Zimmerman J.L., Dellinger R.P. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Intensive Care Med.*, 2017, vol. 43, no. 3, pp. 304–377. doi: 10.1007/s00134-017-4683-6
- Shin J., Hwang S.Y., Jo I.J., Kim W.Y., Ryoo S.M., Kang G.H., Kim K., Jo Y.H., Chung S.P., Joo Y.S., Beom J.H., Yoon Y.H., Han K.S., Lim T.H., Choi H.S., Kwon W.Y., Suh G.J., Choi S.H., Shin T.G.; Korean Shock Society (KoSS) Investigators. Prognostic value of the lactate/albumin ratio for predicting 28-day mortality in critically ill sepsis patients. *Shock*, 2018, vol. 50, no. 5, pp. 545–550. doi: 10.1097/SHK.0000000000001128
- Takegawa R., Kabata D., Shimizu K., Hisano S., Ogura H., Shintani A., Shimazu T. Serum albumin as a risk factor for death in patients with prolonged sepsis: an observational study. *J. Crit. Care*, 2019, vol. 51, pp. 139–144. doi: 10.1016/j.jcrc.2019.02.004
- Thapa S., Prasad P., Shakya Y. Serum lactate albumin ratio as a predictor of mortality in severe sepsis and septic shock at Tribhuvan University Teaching Hospital, Kathmandu. *Birat J. Health Sci.*, 2017, vol. 2, no. 2, pp. 191–195. doi: 10.3126/bjhs.v2i2.18525
- Thomas-Rueddel D.O., Poidinger B., Weiss M., Bach F., Dey K., Häberle H., Kaisers U., Rüdell H., Schädler D., Scheer C., Schreiber T., Schürholz T., Simon P., Sommerer A., Schwarzkopf D., Weyland A., Wöbker G., Reinhart K., Bloos F.; Medical Education for Sepsis Source Control and Antibiotics Study Group. Hyperlactatemia is an independent predictor of mortal-

- ity and denotes distinct subtypes of severe sepsis and septic shock. *J. Crit. Care.*, 2015, vol. 30, no. 2: 439.e1-6. doi: 10.1016/j.jcrc.2014.10.027
19. Van Beest P.A., Brander L., Jansen S.P., Rommes J.H., Kuiper M.A., Spronk P.E. Cumulative lactate and hospital mortality in ICU patients. *Ann. Intensive Care*, 2013, vol. 3, no. 1: 6. doi: 10.1186/2110-5820-3-6
  20. Wang B., Chen G., Cao Y., Xue J., Li J., Wu Y. Correlation of lactate/albumin ratio level to organ failure and mortality in severe sepsis and septic shock. *J. Crit. Care*, 2015, vol. 30, no. 2, pp. 271–275. doi: 10.1016/j.jcrc.2014.10.030
  21. Yin M., Si L., Qin W., Li C., Zhang J., Yang H., Han H., Zhang F., Ding S., Zhou M., Wu D., Chen X., Wang H. Predictive value of serum albumin level for the prognosis of severe sepsis without exogenous human albumin administration: a prospective cohort study. *Intensive Care Med.*, 2018, vol. 33, no. 12, pp. 687–694.

**Авторы:**

**Искандар А.**, специалист по клинической патологии, кафедра клинической патологии медицинского факультета Университета Бравиджая, г. Маланг, Индонезия; Больница общего профиля им. д-ра Сайфула Анвара, г. Маланг, Индонезия;

**Винсентиа М.И.**, специалист клинической патологии медицинского факультета Университета Эйрланга, г. Сурабая, Индонезия;

**Джая В.**, анестезиолог, отделение анестезиологии и реанимации медицинского факультета Университета Бравиджая, г. Маланг, Индонезия; Больница общего профиля им. д-ра Сайфула Анвара, г. Маланг, Индонезия;

**Арияти А.**, д.м.н., кафедра клинической патологии медицинского факультета Университета Эйрланга, г. Сурабая, Индонезия; Больница общего профиля им. д-ра Соэтомо, г. Сурабая, Индонезия;

**Прамадхани А.**, студентка факультета медицины Университета Бравиджая, г. Маланг, Индонезия;

**Априлиа А.**, специалист клинической патологии кафедры клинической патологии медицинского факультета Университета Бравиджая, г. Маланг, Индонезия; Больница общего профиля им. д-ра Сайфула Анвара, г. Маланг, Индонезия.

**Authors:**

**Iskandar A.**, Clinical Pathologist, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia;

Dr. Saiful Anwar General Hospital, Malang, Indonesia;

**Vincentia M.I.**, Clinical Pathologist, Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia;

**Jaya W.**, Anaesthesiologist, Department of Anesthesiology and Intensive Care, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia; Dr. Saiful Anwar General Hospital, Malang, Indonesia;

**Aryati A.**, PhD, MD (Medicine), Professor of Clinical Pathology, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia; Dr. Soetomo General Hospital, Surabaya, Indonesia;

**Pramadhani A.**, Student, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia;

**Aprilia A.**, Clinical Pathologist, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia; Dr. Saiful Anwar General Hospital, Malang, Indonesia.

Поступила в редакцию 02.03.2021  
Отправлена на доработку 05.07.2021  
Принята к печати 07.08.2021

Received 02.03.2021  
Revision received 05.07.2021  
Accepted 07.08.2021

# ЛОКАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ У ПАЦИЕНТОВ С КЛАССИЧЕСКИМ И НЕЯЗВЕННЫМ ТИПОМ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОГО ЦИСТИТА/СИНДРОМА БОЛЕЗНЕННОГО МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Р.Ф. Шолан

Республиканский лечебно-диагностический центр МЗ Азербайджанской Республики, г. Баку, Азербайджан

**Резюме.** На сегодняшний день выдвинуто несколько гипотез по патофизиологии интерстициального цистита/синдрома болезненного мочевого пузыря (ИЦ/СБМП), однако консенсус пока не достигнут. Предполагается, что цитокины участвуют в ИЦ/СБМП так же, как в воспалительных аутоиммунных заболеваниях. В настоящее время проводятся исследования различных биомаркеров ткани мочевого пузыря, включая тучные клетки. Однако недостаточно сообщений о последовательном профиле иммунной активности. Цель исследования — оценка цитокинового профиля, количества тучных и плазматических клеток и их взаимосвязи у пациентов с ИЦ/СБМП с язвой Гуннера и без нее. Обследовано 44 женщины с гуннеровским поражением ИЦ/СБМП (I группа) и 82 женщины с неязвенным типом (II группа). Пациенты проанкетированы по шкале симптомов тазовой боли, императивного учащенного мочеиспускания (PUF), визуальной аналоговой шкале (VAS) и по индексу симптомов интерстициального цистита О’Лири–Санта (ICSI). Под общей анестезией выполнена цистоскопия и гидродистензия мочевого пузыря. В биоптатах стенки мочевого пузыря оценено количество плазмоцитов и тучных клеток, в моче — IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ . Статистическая обработка результатов проведена с помощью программы Statistica 6 (StatSoft, США). Рассчитаны t-критерий Стьюдента, коэффициент корреляции Спирмена. У пациентов с гуннеровским типом ИЦ/СБМП отмечалось несущественное повышение показателей шкал и сниженные величины среднего объема, частоты мочеиспускания, максимального объема опорожнения. Максимальная вместимость мочевого пузыря при гидродистензии была меньше на 42,01% ( $p < 0,001$ ). Уровень IL-8 в I группе в сравнении с величиной во II группе был выше в среднем на 28,57% ( $p = 0,434$ ), IL-6 — на 13,46% ( $p = 0,638$ ), TNF $\alpha$  — на 9,09% ( $p = 0,244$ ) и IL-1 $\beta$  — на 4,13% ( $p = 0,859$ ). Количество тучных клеток у пациентов I группы было выше, чем у пациентов II группы на 40,65% ( $p < 0,05$ ). В I группе заметная связь выявлена между тучными клетками и плазмоцитами ( $r = -0,555$ ,  $p > 0,05$ ), между плазмоцитами и IL-6 ( $r = -0,639$ ,  $p < 0,05$ ). Во II группе заметная связь выявлена между тучными клетками и TNF $\alpha$  ( $r = +0,562$ ,  $p < 0,05$ ). Пациенты с гуннеровским ИЦ/СБМП отличаются выраженным воспалением, в индукции которого участвуют тучные клетки. Определение цитокинов в моче может обеспечить неинвазивное разделение ИЦ/СБМП на язвенные и неязвенные группы.

**Ключевые слова:** интерстициальный цистит, синдром болезненного мочевого пузыря, язва Гуннера, интерстициальный неязвенный цистит, воспаление, цитокины, тучные клетки, плазмоциты.

---

**Адрес для переписки:**

Шолан Рашад Фархад оглы  
AZ1122, Азербайджан, г. Баку, Тбилисский пр., 147,  
Республиканский лечебно-диагностический центр  
МЗ Азербайджанской Республики.  
Тел.: +994 50-212-53-57.  
E-mail: ittihaz@yahoo.com

**Contacts:**

Sholan Rashad Farhad ogly  
AZ1122, Azerbaijan, Baku, Tbilisi pr., 147, Republican Centre  
of Diagnosis and Treatment of the Health Ministry of Azerbaijan.  
Phone: +994 50-212-53-57.  
E-mail: ittihaz@yahoo.com

**Для цитирования:**

Шолан Р.Ф. Локальный иммунный ответ у пациентов с классическим и неязвенным типом интерстициального цистита/синдрома болезненного мочевого пузыря // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1101–1107. doi: 10.15789/2220-7619-LIR-1644

**Citation:**

Sholan R.F. Local immune response in patients with classic and non-ulcer type of interstitial cystitis/bladder pain syndrome // Russian Journal of Infection and Immunity = Infeksiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1101–1107. doi: 10.15789/2220-7619-LIR-1644

## LOCAL IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH CLASSIC AND NON-ULCER TYPE OF INTERSTITIAL CYSTITIS/BLADDER PAIN SYNDROME

Sholan R.F.

Republican Centre of Diagnosis and Treatment of the Health Ministry of Azerbaijan, Baku, Azerbaijan

**Abstract.** Several hypotheses regarding the pathophysiology of interstitial cystitis/bladder pain syndrome (IC/BPS) have been put forward, but no consensus has yet been reached. It is suggested that cytokines are involved in IC/BPS, as well as in inflammatory autoimmune diseases. Examining various biomarkers of bladder tissue, including mast cells is underway. However, few reports on a consistent immune activity profile are available. The aim of the study was to assess the cytokine profile, counts of mast cells and plasma cells as well as their relationship in patients with IC/BPS with and without Hunner's lesions. 44 women with Hunner's lesions (group I) and 82 women with non-ulcer type (group II) were examined. Patients were questioned on the Pelvic Pain Symptom Scale, Urinary Frequency Scale (PUF), Visual Analogue Scale (VAS) and O'Leary–Santa Interstitial Cystitis Symptom Index (ICSI). Cystoscopy and hydrodistension of the bladder were performed under general anesthesia. In biopsies of the bladder wall, the number of plasma cells and mast cells was assessed, in urine — IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ . Statistical processing of the results was carried out using the Statistica 6 software (StatSoft, USA). The Student's t-test, Spearman's correlation coefficient were calculated. In patients with Hunner's ulcer, there was an insignificant increase in the scale indices and decreased magnitude for average volume, urination frequency, and maximum emptying volume. The maximum bladder capacity during hydrodistension was lowered by 42.01% ( $p < 0.001$ ). The level of IL-8 in group I was higher on average by 28.57% ( $p = 0.434$ ) as compared with that in group II, IL-6 — by 13.46% ( $p = 0.638$ ), TNF $\alpha$  — by 9.09% ( $p = 0.244$ ) and IL-1 $\beta$  — by 4.13% ( $p = 0.859$ ). The number of mast cells in patients of group I vs. group II was higher by 40.65% ( $p < 0.05$ ). In group I, a marked relationship was found between count of mast cells and plasma cells ( $r = -0.555$ ,  $p > 0.05$ ), as well as between count of plasma cells and IL-6 level ( $r = -0.639$ ,  $p < 0.05$ ). In group II, a significant connection was found between count of mast cells and TNF $\alpha$  level ( $r = +0.562$ ,  $p < 0.05$ ). Patients with Hunner's IC/BPS are characterized by severe inflammation, wherein mast cells are involved in induction. Determination of cytokines in urine can provide a non-invasive division of IC/BPS into ulcerative and non-ulcerative groups.

**Key words:** interstitial cystitis, bladder pain syndrome, Hunner's ulcer, interstitial cystitis, inflammation, cytokines, mast cells, plasma cells.

## Введение

Интерстициальный цистит/синдром болезненного мочевого пузыря (ИЦ/СБМП) большинством исследователей считается результатом длительного воспаления данного органа [3, 17]. Со временем наблюдается физическое повреждение стенки мочевого пузыря, и вследствие хронического воспаления может возникнуть ее рубцевание и уплотнение.

Высказано несколько гипотез относительно патофизиологии ИЦ/СБМП, но пока консенсуса достичь не удалось. Данный синдром отличается множеством уникальных характеристик, которые при дальнейшем исследовании могут быть использованы для разработки конкретного алгоритма лечения [2]. С другой стороны, развитие ИЦ/СБМП, возможно, связано с влиянием широкого спектра факторов, требующих более тщательного изучения [1, 4, 10]. Диагностика синдрома представляет значительные сложности. Дисфункция уротелия, которая увеличивает проницаемость и снижает его защитную функцию, является одной из потенциальных причин ИЦ/СБМП [16].

ИЦ/СБМП сопровождается симптомами легкой или сильной боли в мочевом пузыре и/или в тазу, а, как известно, в развитии и поддержании боли решающую роль играет иммунная система. Вовлечение иммунной системы может

происходить через цитокины [12]. Экспрессия цитокинов предшествует инфильтрации и адгезии клеток в воспаленную ткань. Врожденная особенность цитокинов может служить основой их значимости в качестве биомаркеров для фенотипической характеристики ИЦ/СБМП. Измерение цитокинов является удобным методом мониторинга активности клеток, участвующих в процессе воспаления в ткани мочевого пузыря [14]. Несмотря на то, что этиология ИЦ/СБМП остается неясной, полагают, что потенциальной причиной патогенеза заболевания, приводящей к афферентной повышенной возбудимости, является воспаление мочевого пузыря, которое связано с продуцированием провоспалительных цитокинов [17]. Предполагается, что цитокины участвуют в ИЦ/СБМП так же, как в воспалительных аутоиммунных заболеваниях [19].

В настоящее время проводятся исследования различных биомаркеров ткани мочевого пузыря, связанных с уротелиальной дисфункцией, включая тучные клетки. Повышенное количество Т-лимфоцитов и плазматических клеток обнаруживается в слое уротелия и собственной пластинке мочевого пузыря при ИЦ/СБМП по сравнению с нормальным мочевым пузырем [15]. Однако пока еще неясно, является ли это повышение причиной или следствием ИЦ/СБМП.

Цель настоящего исследования — оценка цитокинового профиля, количества тучных и плазматических клеток и их взаимосвязи у пациентов с ИЦ/СБМП с язвой Гуннера и без нее.

## Материалы и методы

**Пациенты.** Исследование проводилось в 2016–2018 гг. в Республиканском лечебно-диагностическом центре Министерства здравоохранения Азербайджанской Республики. Обследовано 126 пациентов женского пола с клинически диагностированным ИЦ/СБМП. Диагноз ИЦ/СБМП поставлен с учетом критерий NIDDK (The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease) [13]. Критерии включения: возраст от 20 лет и старше; наличие боли, давления, дискомфорта в нижних мочевых путях продолжительностью более 6 месяцев в условиях отсутствия инфекции или других определяемых причин; отсутствие (по данным цистоскопии) другого поражения мочевого пузыря; отсутствие активной инфекции мочевыводящих путей, нейрогенной дисфункции мочевого пузыря. Критерии исключения: мочекаменная болезнь, выраженный пролапс тазовых органов, инфравезикальная обструкция, тяжелые сердечно-легочные заболевания; острая инфекция мочевыводящих путей, коагулопатия, опухоли органов таза, внутрипузырное лечение ИЦ в течение последних месяцев, беременность и грудное вскармливание.

Пациенты были разделены на 2 группы: I группа — 44 женщины с гуннеровским поражением ИЦ/СБМП; II группа — 82 женщины с неязвенным типом ИЦ/СБМП.

Женщины были ознакомлены с целью исследования и дали письменное согласие на участие. При проведении исследования соблюдались этические принципы Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации [24].

**Методы.** Всем пациентам проведено комплексное обследование, включающее общеклинические диагностические методы. Наряду со сбором данных анамнеза, жалоб, женщин проанкетировали по шкале симптомов тазовой боли, императивного учащенного мочеиспускания (PUF — Pelvic pain and urgency/frequency), визуальной аналоговой шкале (VAS — visual analogue scale) и по индексу симптомов интерстициального цистита О’Лири–Санта (ICSI — O’Leary–Sant Interstitial Cystitis Symptom Index) [9]. Цистоскопию и гидродистензию мочевого пузыря выполняли всем пациентам под общей анестезией (внутривенный наркоз). Цистоскопию проводили с использованием эндоскопов фирмы Olympus (Япония) с оптикой 30° и 70° в условиях эндоскопической операционной. Оценка количества плазматических

и тучных клеток была проведена в биоптатах стенки мочевого пузыря, взятых при цистоскопии, для чего на заключительном этапе выполнена глубокая биопсия стенки мочевого пузыря до мышечного слоя под кратковременным внутривенным наркозом. Образцы фиксировали в 10% буфере нейтрального раствора формалина. Затем выполнялась проводка в спиртовых растворах в концентрациях 75, 85, 95 и 99,9%. Впоследствии образцы содержались в растворе ксилола и заключались в парафиновые блоки, из которых готовили серийные срезы толщиной 3–5 микрон и окрашивали гематоксилин-эозином и по методу Май–Грюнвальда–Гимзы для выявления тучных клеток. Просмотр микропрепаратов выполняли посредством светового микроскопа Olympus Bx 50 (Япония) и системы камер Olympus PM10SP (Япония). В каждом из 10 участков образца подсчитывали плазматические и тучные клетки по следующему принципу: отсутствие экстравакулярных лейкоцитов и тучных клеток — 0 баллов; число тучных клеток и плазмоцитов менее 20 — 1 балл; 20–45 клеток — 2 балла; более 45 клеток — 3 балла. Баллы всех 10 срезов суммировали, делили на 30 (максимально возможный балл) и умножали на 100. Количество плазмоцитов и тучных клеток подсчитывали при увеличении микроскопа  $\times 200$  [7, 8].

Концентрацию интерлейкинов — IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) определяли в утренней моче, для чего использовали основанные на твердофазном варианте иммуноферментного анализа (ИФА) соответствующие тест-системы фирмы «Вектор-Бест» (Россия).

**Статистический анализ.** Статистическая обработка полученных результатов была проведена с помощью программного обеспечения Statistica 6 (StatSoft, США). Показатели выражены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение (SD), а также в процентах. Для сравнения средних значений двух групп применен t-критерий Стьюдента. Коэффициент корреляции рассчитан по Спирмену. При  $p < 0,05$  статистические оценки считали значимыми.

## Результаты

Клиническая характеристика пациентов обследованных групп представлена в табл. 1.

Как видно из табл. 1, пациенты I группы были незначительно старше пациентов II группы, также у них отмечались повышенные показатели шкал и сниженные величины среднего объема, частоты мочеиспускания, максимального объема опорожнения, но различия не носили статистически значимый характер. В то же время максимальная вместимость мочевого пу-

**Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов с ИЦ/СБМП**

Table 1. Characteristics of patients with IC/BPS

Показатель Index	I группа I group (n = 44)	II группа II group (n = 82)	p	t-критерий t-test
<b>Средний возраст, лет</b> Average age, years	58,67±9,93 [33–76]	41,47±12,71 [21–65]	0,288	1,07
<b>Средняя сумма баллов по шкале, баллы</b> Average score on the scale, points				
<b>PUF</b>	20,4±5,11 [15–32]	16,2±3,03 [13–19]	0,481	0,71
<b>VAS</b>	6,5±1,8 [1–10]	6,1±2,0 [0–10]	0,882	0,15
<b>ISCI</b>	14,1±2,02 [10–20]	12,5±3,11 [4–20]	0,667	0,43
<b>Средний объем мочеиспускания, мл</b> Average urination volume, ml	115,8±32,1 [50–230]	134,4±46,42 [40–420]	0,742	0,33
<b>Частота мочеиспусканий, дни</b> Frequency of urination, days	16,2±1,43 [7–30]	14,1±3,57 [5–40]	0,586	0,55
<b>Максимальный объем опорожнения, мл</b> Maximum emptying volume, ml	171,3±38,13 [50–320]	238,5±43,11 [50–540]	0,245	1,17
<b>Максимальная вместимость мочевого пузыря при гидродистензии, мл</b> Maximum bladder capacity with hydrodistortion, ml	500,4±59,22 [200–800]	710,6±22,3 [350–1100]	0,001	3,32

зря при гидродистензии у пациентов I группы была меньше, чем во II группе на 42,01% ( $p < 0,001$ , t-крит. — 3,32).

Статистическая оценка данных по определению концентрации цитокинов в моче, а также плазмочитов и тучных клеток в биоптатах стенки мочевого пузыря у пациентов с ИЦ/СБМП приведена в табл. 2.

Содержание цитокинов в моче и количество плазмочитов в стенке мочевого пузыря у пациентов I группы в сравнении с пациентами II группы в среднем было выше, но статистически значимо не различалось. Уровень

IL-8 в I группе, в сравнении с величиной во II группе, был выше в среднем на 28,57% ( $p = 0,434$ ; t-крит. — 0,78), IL-6 — на 13,46% ( $p = 0,638$ ; t-крит. — 0,47), TNF $\alpha$  — на 9,09% ( $p = 0,244$ ; t-крит. — 1,17) и IL-1 $\beta$  — на 4,13% ( $p = 0,859$ ; t-крит. — 0,18).

Количество тучных клеток у пациентов I группы на 40,65% превышало их содержание у пациентов II группы ( $p < 0,05$ , t-крит. — 3,07).

Проведенный анализ корреляционной связи между исследованными показателями выявил наличие разных по силе и направленности взаимосвязей (табл. 3).

**Таблица 2. Концентрация цитокинов в моче и количество плазмочитов и тучных клеток в биоптатах стенки мочевого пузыря**

Table 2. Concentration of cytokines in urine and the number of plasma cells and mast cells in biopsies of the bladder wall

Показатель Index	I группа I group (n = 44)	II группа II group (n = 82)	p	t-критерий t-test
<b>IL-1<math>\beta</math>, пг/мл</b> IL-1 $\beta$ , pg/ml	92,1±10,86 [84,8–97,7]	88,3±18,44 [80,1–94,5]	0,859	0,18
<b>IL-6, пг/мл</b> IL-6, pg/ml	81,0±6,05 [72,3–88,5]	70,1±8,16 [69,2–80,4]	0,638	0,47
<b>IL-8, пг/мл</b> IL-8, pg/ml	4,2±1,02 [2,54–6,0]	3,0±1,14 [1,8–5,2]	0,434	0,78
<b>TNF<math>\alpha</math>, пг/мл</b> TNF $\alpha$ , pg/ml	78,1±5,15 [71,8–82,5]	71,0±3,21 [64,3–77,8]	0,244	1,17
<b>Тучные клетки, абс.</b> Mast cells, abs.	114,8±14,8 [35–237]	68,1±3,44 [0–168]	0,003	3,07
<b>Плазмочиты, абс.</b> Plasmocytes, abs.	68,7±16,04 [0–221]	56,4±16,72 [0–221]	0,596	0,53

В I группе критическое значение критерия Спирмена составило 0,648. Заметная обратная связь выявлена между тучными клетками и плазмочитами ( $r = -0,555$ ,  $p > 0,05$ ) и между плазмочитами и IL-6 ( $r = -0,639$ ,  $p < 0,05$ ), а между тучными клетками и IL-6 выявлена умеренная прямая статистически незначимая связь ( $r = +0,391$ ,  $p > 0,05$ ). Во II группе критическое значение критерия Спирмена составило 0,415. Заметная прямая статистически значимая связь выявлена между тучными клетками и TNF $\alpha$  ( $r = +0,562$ ,  $p < 0,05$ ), связи между остальными переменными были слабыми и статистически незначимыми.

## Обсуждение

Известно, что экспрессия цитокинов у пациентов с ИЦ/СБМП по сравнению с пациентами без этой патологии приводит к дисбалансу цитокинов [11, 14]. Цитокины являются ключевыми медиаторами иммунных ответов, которые позволяют приводить в действие, активировать и дифференцировать различные иммунные клетки. Мы предположили, что у пациентов с гуннеровским классическим типом ИЦ/СБМП локальная активность цитокинов выше, чем у пациентов с негуннеровским типом.

Сравнительный анализ концентрации цитокинов в моче, количества тучных клеток и плазмочитов в подслизистой оболочке мочевого пузыря показал, что перечисленные показатели выше у пациентов с гуннеровским поражением ИЦ/СБМП, что указывает на тяжесть воспаления.

Сравнительно выраженное увеличение концентрации IL-8 и IL-6 в моче у пациентов с гуннеровским ИЦ/СБМП указывает на локальный иммунный ответ. Полученные результаты сопоставимы с данными других исследователей [11, 14, 18, 22]. По данным Argade S. и соавт. [6], уровни IL-8 (CXCL-8) в моче позволяли различать язвенный и неязвенный ИЦ/СБМП.

Статистически значимо большее количество тучных клеток отмечалось у пациентов с ИЦ/СБМП типа 3С, что сопоставимо с данными ряда авторов [12, 15, 20]. По данным литературы [20], содержание тучных клеток более последовательно увеличивается при классическом типе 3С, а при неязвенном типе результаты анализа тучных клеток мочевого пузыря показывают большие стандартные отклонения.

Тучные клетки относятся к многофункциональным иммунным клеткам, которые развиваются из определенного предшественника костного мозга, перемещаются в периваскулярные пространства тканей и приобретают различные характеристики в зависимости от условий микросреды [21, 23]. Исходя из того, что у обследованных нами пациентов с гуннеров-

**Таблица 3. Корреляционные связи между переменными**

Table 3. Correlation relationships between variables

Показатель Index	I группа I group (n = 44)		II группа II group (n = 82)	
	r	p	R	p
Тучные клетки/IL-1 $\beta$ Mast cells/IL-1 $\beta$	-0,009	> 0,05	0,034	> 0,05
IL-6	+0,391	> 0,05	-0,110	> 0,05
IL-8	+0,291	> 0,05	0,088	> 0,05
TNF $\alpha$	+0,082	> 0,05	0,562	< 0,05
Плазмочиты Plasmocytes	-0,555	> 0,05	-0,082	> 0,05
Плазмочиты/IL-1 Plasmocytes/IL-1	+0,082	> 0,05	0,151	> 0,05
IL-6	-0,639	< 0,05	0,290	> 0,05
IL-8	+0,070	> 0,05	0,107	> 0,05
TNF $\alpha$	+0,082	> 0,05	-0,074	> 0,05

скими поражениями количество тучных клеток было 40,65% и выше, можно предположить, что они способны повреждать слизистую оболочку мочевого пузыря и привлекать IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , которые, воздействуя на иммунокомпетентные клетки, способствуют развитию воспаления. Таким образом, не исключается участие тучных клеток в патогенезе гуннеровского ИЦ/СБМП. Этот факт подтверждают сообщения о количестве тучных клеток и их активации в слизистой оболочке мочевого пузыря [12, 15, 20]. Нужно отметить, что известные этиологические теории ИЦ/СБМП наряду с другими включают активацию тучных клеток [12].

В группе с неязвенным типом ИЦ/СБМП установлена слабая корреляция тучных клеток с IL-1 $\beta$  ( $r = +0,034$ ,  $p > 0,05$ ) и другими цитокинами; наряду с этим выявлялась заметная корреляция тучных клеток с TNF $\alpha$  ( $r = +0,562$ ,  $p < 0,05$ ). Однако с усилением воспалительного процесса связи изменялись. В группе с классическим типом тучные клетки коррелировали с провоспалительными цитокинами (IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ) прямой слабой связью и крайне слабой связью с IL-1 $\beta$  ( $r = -0,009$ ,  $p > 0,05$ ).

Полученные нами результаты свидетельствуют о почти одинаковом количестве плазмочитов в обеих группах исследования. Известно, что плазматические клетки — это дифференцированные клетки, они обладают способностью секретировать антитела и отвечают за опосредованный антителами иммунитет [5, 12]. В литературе сообщается, что повышенное количество плазмочитов встречается у значительной части пациентов с этим заболеванием [12]. Плазмочиты в обеих группах исследования коррелировали с провоспалительными цито-

кинами слабой связью. Однако в группе с классическим типом выявлялась заметная отрицательная корреляция с IL-6 ( $r = -0,639$ ,  $p < 0,05$ ), хотя в группе с неязвенным типом они коррелировали между собой слабой положительной связью ( $r = +0,290$ ,  $p > 0,05$ ).

Согласно полученным результатам у пациентов с классическим ИЦ/СБМП имело место повышение уровня цитокинов и количества тучных клеток по сравнению с пациентами с негуннеровским типом. Обычно предполагается, что белки-биомаркеры, обнаруживаемые в моче, отражают подлинную биохимию очага заболевания, с которым они остаются в тесном контакте. Полагаем, что определение цитокинов в моче может обеспечить неинвазивное разделение ИЦ/СБМП на язвенные и неязвенные.

Таким образом, определение цитокинов в моче немаловажно для клинико-патологической характеристики типов ИЦ/СБМП. У паци-

ентов с гуннеровским ИЦ/СБМП имеет место выраженное воспаление по сравнению с пациентами с неязвенным типом из-за повышенного количества тучных клеток, цитокинов. Тучные клетки участвуют в индукции воспалительного процесса, возможно, посредством высвобождения медиаторов. Выявление повышенных уровней провоспалительных цитокинов, участвующих в воспалении при ИЦ/СБМП и в восстановлении тканей, может способствовать диагностике этого синдрома.

## Благодарности

Автор выражает благодарность сотрудникам отделения почечных болезней и трансплантологии Республиканского лечебно-диагностического центра и центральной научно-исследовательской лаборатории Азербайджанского медицинского университета.

## Список литературы/References

1. Зайцев А.В., Шаров М.Н., Ибрагимов Р.А., Нахрапов Д.И., Пушкарь Д.Ю. Синдром болезненного мочевого пузыря/интерстициальный цистит: современные подходы к диагностике и лечению // Врач скорой помощи. 2018. № 8. С. 16–26. [Zaitsev A.V., Sharov M.N., Arefieva O.A., Pushkar D.Yu. Interstitial cystitis/bladder pain syndrome: factors predicting the clinical course of the disease. *Vrach skoroy pomoshchi = Emergency Doctor*, 2018, no. 8, pp. 16–26. (In Russ.)] doi: 10.21886/2308-6424-2018-6-3-26-35
2. Кузьмин И.В., Игнашов Ю.А., Слесаревская М.Н., Аль-Шукри С.Х. Синдром болезненного мочевого пузыря у женщин: критерии эффективности и прогнозирование результатов лечения // Экспериментальная и клиническая урология. 2020. № 2. С. 142–148. [Kuzmin I.V., Ignashov Ju.A., Slesarevskaja M.N., Al-Shukri S.H. Bladder pain syndrome in women: criteria for efficacy and predicting treatment outcomes. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya urologia = Experimental and Clinical Urology*, 2020, no. 2, pp. 142–148. (In Russ.)] doi: 10.29188/2222-8543-2020-12-2-142-148
3. Лоран О.Б., Синякова Л.А., Митрохин А.А., Плесовский А.М., Штейнберг М.Л., Винарова Н.А. Современный взгляд на проблему интерстициального цистита // Медицинский совет. 2011. № 11–12. С. 15–19. [Loran O.B., Sinjakova L.A., Mitrohin A.A., Plesovskij A.M., Shtejnberg M.L., Vinarova N.A. Modern view of the problem of interstitial cystitis. *Meditsinskiy sovet = Medical Advice*, 2011, no. 11–12, pp. 15–19. (In Russ.)]
4. Оношко В.Ф., Кириленко Е.А., Баранова Е.О., Голубева В.С. Интерстициальный цистит или синдром болезненного мочевого пузыря: современный взгляд на проблему // Acta Biomedica Scientifica. 2016. Т. 1, № 1. С. 65–69. [Onopko V.F., Kirilenko E.A., Baranova E.O., Golubeva V.S. Interstitial cystitis or bladder pain syndrome: a modern perspective on the problem. *Acta Biomedica Scientifica*, 2016, vol. 1, no. 1, pp. 65–69. (In Russ.)] doi: 10.12737/21489
5. Akiyama Y., Morikawa T., Maeda D., Shintani Y., Niimi A., Nomiyama A., Nakayama A., Igawa Y., Fukayama M., Homma Y. Increased CXCR3 expression of infiltrating plasma cells in Hunner type interstitial cystitis. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6: 28652. doi: 10.1038/srep28652
6. Argade S., Chermansky C., Tyagi P. Biomarkers for interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Womens Health (Lond)*, 2016, vol. 12, no. 1, pp. 87–90. doi: 10.2217/wh.15.93
7. Bayrak O., Seckiner I., Solakhan M., Karakok M., Erturhan S.M., Yagci F. Effects of intravesical dextranthenol use on lipid peroxidation and bladder histology in a chemical cystitis animal model. *Urology*, 2012, vol. 79, pp. 1023–1026. doi: 10.1016/j.urology.2012.01.025
8. Bjorling D.E., Jerde T.J., Zine M.J., Busser B.W., Saban M.R., Saban R. Mast cells mediate the severity of experimental cystitis in mice. *J. Urology*, 1999, vol. 162, no. 1, pp. 231–236. doi: 10.1097/00005392-199907000-00073
9. Chung S.D., Liao C.H., Chen Y.C., Kuo H.C. Urgency severity scale could predict urodynamic detrusor overactivity in patients with overactive bladder syndrome. *Neurourol. Urodyn.*, 2011, vol. 30, pp. 1300–1304. doi: 10.1002/nau.21057
10. Fall M., Pecker R. Classic interstitial cystitis: unrelated to BPS. *Curr. Bladder Dysfunct. Rep.*, 2015, vol. 10, pp. 95–102. doi: 10.1007/s11884-014-0273-4
11. Furuta A., Suzuki Y., Egawa S., Yamamoto T., Yoshimura N. Pathophysiology of interstitial cystitis with or without Hunner lesion. *Int. J. Urol.*, 2019, vol. 26, no. 1, pp. 77–78. doi: 10.1111/iju.13980
12. Gamper M., Regauer S., Welter J., Eberhard J., Viereck V. Are mast cells still good biomarkers for bladder pain syndrome/interstitial cystitis? *J. Urology*, 2015, vol. 193, pp. 1994–2000. doi: 10.1016/j.juro.2015.01.036
13. Gillenwater J.Y., Wein A.J. Summary of the National Institute of Arthritis, Diabetes and Kidney Diseases. Workshop on interstitial cystitis. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, August 28–29, 1987. *J. Urology*, 1988, vol. 140, pp. 203–206. doi: 10.1016/s0022-5347(17)41529-1
14. Gonzalez E.J., Arms L., Vizzard M.A. The role(s) of cytokines/chemokines in urinary bladder inflammation and dysfunction. *Biomed Res. Int.*, 2014, vol. 2014: 120525. doi: 10.1155/2014/120525

15. Grover S., Srivastava A., Lee R., Tewari A.K. Role of inflammation in bladder function and interstitial cystitis. *Ther. Adv. Urol.*, 2011, vol. 3, no. 1, pp. 19–33. doi: 10.1177/1756287211398255
16. Homma Y., Ueda T., Tomoe H., Lin A.T., Kuo H.C., Lee M.H., Oh J.S., Kim J.C., Lee K.S. Clinical guidelines for interstitial cystitis and hypersensitive bladder updated in 2015. *Int. J. Urology*, 2016, vol. 23, pp. 542–549. doi: 10.1111/iju.13118
17. Ke Q.-S., Kuo H.-C. Pathophysiology of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Tzu Chi Med. J.*, 2015, vol. 27, no. 4, pp. 139–144. doi: 10.1016/j.tcmj.2015.09.006
18. Liu H.-T., Kuo H.-C. Biomarkers for patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Urol. Sci.*, 2015, vol. 26, no. 4, pp. 225–229. doi: 10.1016/j.urols.2015.02.002
19. Logadottir Yr., Delbro D., Lindholm C., Fall M., Peeker R. Inflammation characteristics in bladder pain syndrome ESSIC type 3C/classic interstitial cystitis. *Int. J. Urol.*, 2014, vol. 21, no. 1, pp. 75–78. doi: 10.1111/iju.12370
20. Sant G.R., Kempuraj D., Marchand J.E., Theoharides T.C. The mast cell in interstitial cystitis: role in pathophysiology and pathogenesis. *Urology*, 2007, vol. 69, no. 4A, pp. 34–40. doi: 10.1016/j.urology.2006.08.1109
21. Theoharides T.C., Alysandratos K.-D., Angelidou A., Delivanis D.-A., Sismanopoulos N., Zhang B., Asadi S., Vasiadi M., Weng Z., Minati A., Kalogeromitros D. Mast cells and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, vol. 1822, no. 1, pp. 21–33. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.12.014
22. Vera P.L., Preston D.M., Moldwin R.M., Erickson D.R., Mowlazadeh B., Ma F., Kouzoukas D.E., Meyer-Siegler K.L., Fall M. Elevated urine levels of macrophage migration inhibitory factor in inflammatory bladder conditions: a potential biomarker for a subgroup of interstitial cystitis/bladder pain syndrome patients. *Urology*, 2018, vol. 116, pp. 55–62. doi: 10.1016/j.urology.2018.02.039
23. Wang X., Liu W., O'Donnell M., Lutgendorf S., Bradley C., Schrepf A., Liu L., Kreder K., Luo Y. Evidence for the role of mast cells in cystitis-associated lower urinary tract dysfunction: a multidisciplinary approach to the study of chronic pelvic pain research network animal model study. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 12: e0168772. doi: 10.1371/journal.pone.0168772
24. WMA. Declaration of Helsinki Ethical Principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 2013, vol. 310, no. 20, pp. 2191–2194. doi: 10.1001/jama.2013.281053

---

**Автор:**

**Шолан Р.Ф.**, к.м.н., зав. отделением почечных болезней и трансплантологии Республиканского лечебно-диагностического центра МЗ Азербайджанской Республики, Баку, Азербайджан.

**Author:**

**Sholan R.F.**, PhD (Medicine), Head of the Department of Kidney Diseases and Transplantology, Republican Centre of Diagnosis and Treatment of the Health Ministry of Azerbaijan, Baku, Azerbaijan.

---

Поступила в редакцию 23.11.2020  
Принята к печати 31.10.2021

Received 23.11.2020  
Accepted 31.10.2021

# МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НЕТИПИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА

Д.С. Кутилин

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

**Резюме.** *Актуальность.* Исследования последних десятилетий показали, что классические методы микробиологии позволяют выявлять лишь незначительную, поддающуюся культивированию, часть микроорганизмов. Одним из современных подходов, позволяющих выявлять широкий спектр бактерий и архей, является разновидность метагеномного анализа, выполняемая путем высокопроизводительного секвенирования библиотек фрагментов рибосомальных оперонов. Цель данного исследования — метагеномный анализ образцов из уrogenитального тракта пациентов с хроническим воспалительным процессом для идентификации патогенов, не выявляемых другими методами. *Методы.* Таксономический анализ бактериального сообщества проводили путем высокопроизводительного секвенирования гипервариабельной области V3–V4 гена 16S рРНК на платформе Illumina HiSeq 3000. *Результаты.* Проведенное исследование позволило выявить таксономическое многообразие микроорганизмов в образцах из уrogenитального тракта (выявлено от 197 до 794 различных микроорганизмов, относящихся к домену *Bacteria*), а также установить дифференциальные различия, касающиеся представителей родов *Megasphaera*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Pedobacter*, *Mobiluncus*, *Phormidium*, *Sphingobacterium*, *Temperatibacter*, *Oxobacter*, *Georgenia*, *Actinobaculum*, *Varibaculum*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sedimihabitans*, *Actinobacter*, *Actinoplanes*, *Spirochaeta*, *Enhydrobacter*, *Thermacetogenium*, *Bdellovibrio*, *Oleibacter*, *Porphyromonas*, *Klebsiella*, *Lachnoclostridium*, *Caulobacter*, *Xanthomonas*, *Novispirillum*, *Marvinbryantia*, *Afipia*, *Shinella*, *Tepidimonas*, *Faecalibacterium*, *Paludibacterium*, *Aerococcus*, *Campylobacter*, *Pasteurella*, *Rumen*, *Psychrobacter*, *Haemophilus*, *Brevibacillus*, *Sporosarcina*, *Yaniella* и *Lactobacillus* из образцов, полученных от больных с хроническими воспалительными процессами и от условно здоровых индивидуумов. *Заключение.* Были обнаружены дифференциальные различия в составе микробиома образцов от больных с хроническими воспалительными процессами и условно здоровых индивидуумов, касающиеся представителей 44 родов, в том числе *Megasphaera*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Pedobacter*, *Mobiluncus*, *Phormidium* и *Lactobacillus*. Наблюдаемые воспалительные процессы в уrogenитальном тракте пациентов могут быть ассоциированы с дисбалансом микрофлоры — снижением типичных представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus* и увеличением численности представителей родов *Klebsiella* и *Citrobacter*.

**Ключевые слова:** уrogenитальный тракт, инфекции, хроническое воспаление, высокопроизводительное секвенирование, 16S рРНК, дискриминантный анализ.

---

**Адрес для переписки:**

Кутилин Денис Сергеевич  
344037, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63,  
ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр  
онкологии МЗ РФ.  
Тел.: 8 951 538-50-39.  
E-mail: k.denees@yandex.ru

**Contacts:**

Denis S. Kutilin  
344037, Russian Federation, Rostov-on-Don, Liniya 14 str., 63,  
National Medical Research Oncology Center.  
Phone: +7 951 538-50-39.  
E-mail: k.denees@yandex.ru

**Для цитирования:**

Кутилин Д.С. Метагеномный анализ для идентификации возбудителей нетипичных инфекций уrogenитального тракта // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1108–1122. doi: 10.15789/2220-7619-MAT-1713

**Citation:**

Kutilin D.S. Metagenomic analysis to identify the causative agents of atypical urogenital tract infections // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1108–1122. doi: 10.15789/2220-7619-MAT-1713

## METAGENOMIC ANALYSIS TO IDENTIFY THE CAUSATIVE AGENTS OF ATYPICAL UROGENITAL TRACT INFECTIONS

Kutilin D.S.

National Medical Research Oncology Center, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Abstract.** *Background.* Research in recent decades has shown that classical microbiological methods can only detect a small, cultivable portion of microorganisms. One of the modern approaches to detect a wide range of bacteria and archaea is presented as a type of metagenomic analysis performed by high-throughput sequencing of ribosomal operon fragment libraries. Objective is to conduct metagenomic analysis of samples from the urogenital tract of patients with chronic inflammation to identify pathogens not detected by other methods. *Methods.* Taxonomic analysis of the bacterial community was performed by high-throughput sequencing of the V3–V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene by using the Illumina HiSeq 3000 platform. *Results.* The study allowed to identify the taxonomic diversity of microorganisms in samples from the urogenital tract (from 197 to 794 different microorganisms belonging to the *Bacteria* were identified), as well as to establish differential differences concerning members of the genera *Megasphaera*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Pedobacter*, *Mobiluncus*, *Phobormidium*, *Sphing Temperatibacter*, *Oxobacter*, *Georgenia*, *Actinobaculum*, *Varibaculum*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sediminihabitans*, *Actinobacter*, *Actinoplanes*, *Spirochaeta*, *Enhydrobacter*, *Thermacetogenium*, *Bdellovibrio*, *Oleibacter*, *Porphyromonas*, *Klebsiella*, *Lachnoclostridium*, *Caulobacter*, *Xanthomonas*, *Novispirillum*, *Marvinbryantia*, *Afipia*, *Shinella*, *Tepidimonas*, *Faecalibacterium*, *Paludibacterium*, *Aerococcus*, *Campylobacter*, *Pasteurella*, *Rumen*, *Psychrobacter*, *Haemophilus*, *Brevibacillus*, *Sporosarcina*, *Yaniella* and *Lactobacillus* between samples from patients with chronic inflammation and apparently healthy individuals. *Conclusion.* Differential differences were found in the composition of the microbiome from the samples of patients with chronic inflammation and apparently healthy individuals, concerning members of 44 genera, including *Megasphaera*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Pedobacter*, *Mobiluncus*, *Phormidium* and *Lactobacillus*. The inflammatory processes observed in the patient urogenital tract can be associated with imbalanced microflora such as decreased level of typical members of the genera *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Lactobacillus*, but increased number of members from of the genera *Klebsiella* and *Citrobacter*.

**Key words:** urogenital tract, infections, chronic inflammation, high-throughput sequencing, 16S rRNA, discriminant analysis.

## Введение

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) относятся к наиболее частым инфекционным заболеваниям и включают инфекции нижних (инфекции уrogenитального тракта, цистит и простатит) и верхних мочевыводящих путей [14]. Уrogenитальные инфекции — группа заболеваний органов мочеполовой системы, характеризующихся воспалительным процессом и повреждением тканей [14]. Возбудителями таких болезней являются патогенные микроорганизмы, проникающие в органы при незащищенном половом контакте, бытовом заражении, медицинских процедурах и нарушении работы иммунной системы. В литературе представлено множество сведений о влиянии подобных инфекций на развитие злокачественных опухолей мочеполовой системы (например, мочевого пузыря) [14]. Воспаление является основным фактором развития рака, но взаимосвязь между ИМП и развитием злокачественных новообразований исследована мало [4].

Инфекции мочевыводящих путей чаще всего вызывают воспаление мочевого пузыря (цистит) или уретры (уретрит). Хронические воспалительные процессы в мочеиспускательном канале, в том числе в передней уретре, являются основной причиной простатитов и снижения фертильности. Некоторые авторы считают,

что именно уретра чаще всего является входными воротами для поступления инфекции в предстательную железу [3]. Инфекции, проникающие из уретры в репродуктивные органы мужчин, приводят также к эпидидимиту (воспалению придатка яичка) и орхиту (воспалению яичка) [22]. Одним из вариантов воспалительных заболеваний уретры может быть так называемый негонококковый уретрит, характеризующийся уретральными симптомами, включая дизурию и зуд, выделения из уретры, повышение количества полиморфно-ядерных лейкоцитов в уретре. Наиболее частой причиной являются *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis* и *Haemophilus influenza*, однако в ряде случаев возбудитель остается неустановленным. К осложнениям негонококкового уретрита относят эпидидимит, стриктуры уретры, простатит и реактивный артрит, а к отдаленным последствиям — рак уретры [27]. Поэтому точный диагноз и раннее лечение имеют решающее значение из-за риска долгосрочных последствий, включая хроническое заболевание [15].

В настоящее время диагноз ИМП в первую очередь основан на наличии симптомов в сочетании с результатами быстрого диагностического теста (нитритные тест-полоски) на наличие бактерий в моче и полуколичественного измерения лейкоцитов в моче. Хотя посев мочи остается золотым стандартом диагнос-

тики ИМП, он требует много времени и позволяет выявлять лишь незначительную часть микроорганизмов, поддающихся культивированию [20].

Исследованиями установлено, что во многих биологических средах присутствуют большие группы микроорганизмов, которые нельзя вырастить в лабораторной культуре. Изучение последовательностей 16S рРНК, которые довольно коротки, часто консервативны в пределах одного вида и, как правило, различаются от вида к виду, показало, что всего лишь 1% видов, обнаруживаемых в образце, принадлежит к числу культивируемых. Одним из современных подходов, позволяющих выявить намного более широкий спектр бактерий и архей, является разновидность метагеномного анализа (раздела молекулярной биологии, в котором изучается генетический материал всех микроорганизмов, находящихся в образце), выполняемая путем высокопроизводительного секвенирования библиотек фрагментов рибосомальных оперонов [21, 26].

В практике онкоурологов распространены случаи, когда развитие патологии ассоциировано с хроническим инфекционным процессом в анамнезе [4]. При этом очень часто возбудитель инфекции не установлен [21], однако данные из истории болезни пациентов (общий анализ крови (ОАК), общий анализ мочи (ОАМ), биохимия крови, УЗИ, КТ) свидетельствуют об инфекционном процессе.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы стал метагеномный анализ образцов из урогенитального тракта пациентов с хроническим воспалительным процессом для идентификации патогенов, не выявляемых другими методами.

## Материалы и методы

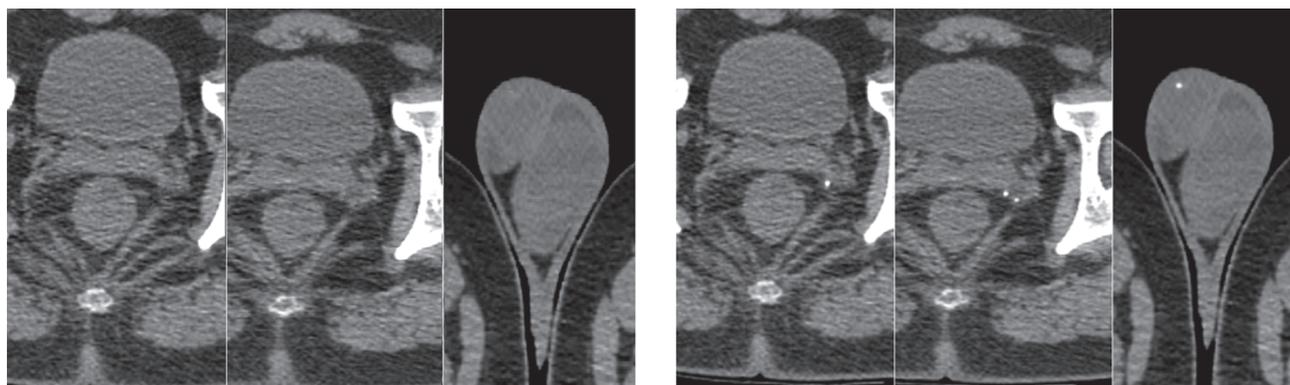
**Пациенты и клиническая картина.** Среди пациентов, обратившихся для профилактического осмотра по поводу онкопатологии предстательной железы в 2018 г., было выбрано 3 интересных клинических случая. В ходе проведенных диагностических мероприятий (ОАК, ОАМ, онкомаркеры, УЗИ, МРТ) у этих пациентов онкопатологии обнаружено не было, выявлена доброкачественная гиперплазия предстательной железы. Пациенты предъявляли жалобы на жжение и дискомфорт в области наружного отверстия мочеиспускательного канала, хронические боли в области мошонки и учащенное мочеиспускание. С этими симптомами все 3 пациента наблюдались у уролога по месту жительства в течение нескольких лет. Из истории болезни были извлечены следующие сведения: у всех пациентов на момент первичного обращения к урологу был повышен уровень лейкоцитов

в моче (> 20 в поле зрения), был проведен ПЦР-скрининг на ИППП (патогенные микроорганизмы не выявлены), всем пациентам дважды было выполнено МРТ малого таза и мошонки, УЗИ простаты, мочевого пузыря и мошонки (у всех выявлены множественные микрокисты и кальцинаты [рис. 1]), выполнены классические микробиологические исследования (микроскопирование и бакпосев: выявлены *Staphylococcus epidermidis* и *Corynebacterium* spp. в клинически незначимом количестве менее  $10^3$  КОЕ/мл, выявлен *E. faecalis*  $10^5$ – $10^8$ ). На основании данных бакпосева и чувствительности *E. faecalis* к антибиотикам урологом была назначена антибактериальная терапия (Амоксиклав). Проведенная антибактериальная терапия не оказала влияние на общую симптоматику, самочувствие пациентов не улучшилось.

Результаты ОАМ и ОАК свидетельствовали о текущем воспалении. В ОАМ (с микроскопией осадка) удельный вес был повышен в образцах всех пациентов (1,037–1,039), так же как и количество лейкоцитов (15–25 клеток в поле зрения), во всех образцах обнаружена слизь. Микроскопическое исследование мазков и осадка мочи выявило наличие кокков у всех пациентов, а также отсутствие спор или мицелия грибов. Образцы мочи и урогенитальных мазков были направлены на повторный бакпосев и ПЦР-анализ инфекций.

Для исследования микрофлоры урогенитального тракта брали соскобы, используя универсальный зонд ЗГУ ЦМ. Для исключения искажений результатов определения состава микрофлоры урогенитального тракта мужчин из-за присутствия транзитной микрофлоры в течение 3 дней перед взятием биоматериала рекомендовали пациентам и условно здоровым индивидуумам воздержаться от половых контактов. Перед взятием биоматериала рекомендовали воздержаться от мочеиспускания в течение 2 ч. Непосредственно перед взятием биоматериала наружное отверстие уретры обрабатывали стерильным тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором. Взятие урогенитальных соскобов проводилось в стерильные пластиковые пробирки объемом 1,5 мл с транспортной средой для ПЦР-исследований. Уретральный зонд вводился в уретру на глубину 2–3 см, затем осторожными вращательными движениями извлекался из нее.

В бакпосеве мочи и мазках обнаружено следующее: пациент 1 — *S. lentus*  $10^4$ , *E. faecalis*  $10^1$ , *S. epidermidis*  $10^7$ , *Corynebacterium* spp.  $10^5$  КОЕ/мл; пациент 2 — *E. faecalis*  $10^2$ , *S. epidermidis*  $10^7$ , *Corynebacterium* spp.  $10^5$  КОЕ/мл; пациент 3 — *S. hominis*  $10^8$ , *E. faecalis*  $10^3$ , *Corynebacterium* spp.  $10^5$  КОЕ/мл. Методом ПЦР патогенных бакте-



**Рисунок 1. Магнитно-резонансная томография (МРТ) малого таза и мошонки пациентов 1, 2 и 3**

Figure 1. Magnetic resonance imaging (MRI) of the pelvis and scrotum in patients 1, 2 and 3

**Примечания.** Слева — через две недели после начала заболевания, справа — через 37 дней после начала заболевания (отчетливо видны включения белого цвета — кальцинаты [патологические скопления солей кальция]).

Notes. Left — two weeks after the onset of the disease, right — 37 days after the onset of the disease (white inclusions are clearly visible depicting calcifications [pathological accumulations of calcium salts]).

рий (*Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*) и грибов (*Candida* spp. (*C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. guilliermondii*), *Cryptococcus* spp.) выявлено не было, во всех образцах были обнаружены *Corynebacterium* spp. и группа *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp. на уровне ниже порогового (клинически не значимо) (тест «Андрофлор» [ДНК-Технология, Россия]). Также проведено комплексное исследование методом ПЦР в реальном времени на наличие вирусных инфекций HTLV (1 и 2 типов), *Adenovirus* spp., вирусов герпеса (HHV-1, -2, -4 (ВЭБ), -5 (ЦМВ), -6 и -8), определение ДНК ВПЧ (вируса папилломы человека) высокого онкогенного риска (тип 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) и *Pegivirus A* (GBV-C). Результаты отрицательные — ни у одного из трех пациентов не была обнаружена ДНК/РНК вирусов.

Контрольную группу составили двое условно здоровых мужчины, у которых были взяты соответствующие мазки и анализы (в ОАМ лейкоцитов < 5, специфические жалобы в анамнезе отсутствуют, результаты теста «Андрофлор» сопоставимы с результатами пациентов).

Возраст пациентов на момент взятия биоматериала: пациент № 1 — 33 года, пациент № 2 — 41 год и пациент № 3 — 35 лет. Возраст условно здоровых мужчины составлял 32 и 34 года. У пациентов и у лиц контрольной группы данные о наличии в анамнезе сахарного диабета отсутствовали.

**Подготовка библиотек и секвенирование.** Для выделения ДНК из образцов был использован набор реактивов «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) со-

гласно инструкции производителя. Концентрацию геномной ДНК измеряли при помощи набора Quant-iT dsDNA HS Assay Kit на приборе Qubit Fluorimeter (Invitrogen, США). Качество ДНК определяли электрофорезом в 0,8% агарозном геле. Таксономический состав бактериального сообщества устанавливали на основании анализа ампликонных библиотек фрагментов рибосомальных оперонов. Таксономический анализ бактериального сообщества проводили с универсальными праймерами 319F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')/806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') на гипервариабельную область V3–V4 гена 16S рРНК, специфичными для широкого круга микроорганизмов, включая бактерии и археи [6, 10, 12]. Все праймеры имели служебные последовательности, содержащие линкеры (необходимые для секвенирования по технологии Illumina), и особую последовательность (индекс), так называемый спейсер гетерогенности (heterogeneity spacers) длиной 12 п.н. [16]. Амплификация фрагментов гена 16S рРНК была проведена с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, представленных в табл. 1.

ПЦР была проведена в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 0,5 ед. активности полимеразы Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, США), по 5 пкМ прямого и обратного праймеров, 10 нг ДНК-матрицы и 0,2 мМ каждого dNTP (LifeTechnologies, США). Смесь денатурировали при 94°C 1 мин, после чего следовало 35 циклов: 94°C — 30 с, 50°C — 30 с, 72°C — 30 с, далее финальная элонгация при 72°C 3 мин. Электрофорез продуктов амплификации проводили в 1,5% агарозном геле. Фрагменты были элюированы из геля с использованием QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США). Дальнейшую подготовку библиотек проводили

**Таблица 1. Последовательности праймеров, использованные для амплификации фрагментов гена 16S рРНК [9]**

Table 1. Primers sequences used for amplification of 16S rRNA gene fragments [9]

Наименование праймера Primer name	Последовательность праймера (5'→3') Primer sequence (5'→3')
<b>319F1</b>	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTAAACTACGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
<b>319F2</b>	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCAGATCCAACACTCCTACGGGAGGCAGCAG
<b>806R1</b>	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCTAAACTACGGGGACTACHVGGGTWTCTAAT
<b>806R2</b>	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTGCAGATCCAACGGACTACHVGGGTWTCTAAT
<b>806R3</b>	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCATCACATAGGGGACTACHVGGGTWTCTAAT

в соответствии с инструкцией производителя HiSeq Reagent Kit Preparation Guide (Illumina, США). Библиотеки секвенировали в соответствии с инструкцией изготовителя на приборе Illumina HiSeq 3000 (Illumina, США) парно-концевым методом по 150 нуклеотидов с каждого конца. Подготовка библиотек и высокопроизводительное секвенирование на платформе Illumina HiSeq 3000 выполнено в компании ООО «Эльген» (Россия).

**Биоинформационный анализ.** Данные, полученные в результате секвенирования образцов, обрабатывались с использованием пакетов ПО Trimmomatic [7] и QIIME [9]. На первом этапе производился первичный анализ качества прочтения, отбор последовательностей на основе качества чтения отдельных оснований (base pair quality), объединение парноконцевых последовательностей с участком перекрытия не менее 35 оснований (с помощью FLASH), а также удаление последовательностей, длина которых составляет менее 150 п.н. На втором этапе обработки осуществлялось удаление из библиотек всех служебных участков (праймеров), оценка на предмет химер с помощью UCLUST (режим *de novo*) [11] и проверка на наличие контаминации, связанной с *Homo sapiens*, с использованием Bowtie2 [18] (поиск по NCBI Homo sapiens Annotation Release 106 с последующим поиском BLASTN в базе данных GreenGenes 16S (v13.05) для идентификации невыровненных последовательностей, связанных с организмом-хозяином — хостом). Считывания, отнесенные RDP-классификатором [29] к контаминации генетическим материалом митохондрий (minimum confidence — 50%), были удалены.

Таксономическая идентификация последовательностей 16S высокого качества проводилась с помощью баз данных RDP (SILVA, <https://ngs.arb-silva.de>), CosmosID Metagenomics (подход, основанный на kmer и использующий платформу Genbook, [www.cosmosid.com](http://www.cosmosid.com)), KEGG

Pathogen, MicrobeNet (A CDC Virtual Reference Laboratory, <https://microbenet.cdc.gov>) и PATRIC 3.6.8 (Pathosystems Resource Integration Center, <https://www.patricbrc.org>).

Линейный дискриминантный анализ (Linear Discriminant Analysis, LDA) бактериального сообщества в группе пациентов и группе условно здоровых индивидуумов проводили на языке R (функция *lda()* базового пакета MASS). Для построения диаграмм Эдвардса—Венна использовали собственные скрипты (JavaScript).

## Результаты

В результате проведенного секвенирования у пациента № 1 обнаружено 197 различных микроорганизмов, относящихся к одному домену, *Bacteria*, и 13 типам (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, *Cloacimonetes*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Armatimonadetes*, *Cyanobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Saccharibacteria*, *Synergistetes*). Из 197 микроорганизмов только для 38 были установлены названия видов (19,2%). При этом количество этих 38 видов относительно всех обнаруженных микроорганизмов не превышало 2,2%. В образце преобладали *Bacillus cereus*, *Trabulsisiella farmeri*, *Corynebacterium* sp. oral strain a43s, *Prevotella rumen bacterium rfn2*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Prevotella* sp. oral clone ah125, *Prevotella* sp. 152r-1a, *Pseudomonas nitroreducens* и *Veillonella parvula*. Для 97,8% микроорганизмов с использование соответствующих баз данных были установлены только названия родов и семейств. Наиболее часто встречались представители следующих родов бактерий: *Prevotella* (78,6%), *Veillonella* (9,3%), *Megasphaera* (1,9%), *Dialister* (0,8%), *Pseudomonas* (1,1%), *Clostridium* (0,5%), *Enterococcus* (0,2%) и *Mobiluncus* (0,2%).

У пациента № 2 обнаружено 364 различных микроорганизма, относящихся к одному домену, *Bacteria*, и 11 типам (*Firmicutes*, *Proteobacteria*,

*Bacteroidetes, Actinobacteria, Chloroflexi, Planctomycetes, Armatimonadetes, Synergistetes, Cyanobacteria, Spirochaetae, Tenericutes*). От состава микробиома предыдущего пациента этот состав отличался отсутствием представителей трех таксономических типов — *Cloacimonetes, Acidobacteria* и *Gemmatimonadetes*. Из 364 микроорганизмов только для 70 (19,2%) были установлены названия видов. При этом количество данных 70 видов относительно всех обнаруженных микроорганизмов не превышало 3,1%. Наиболее часто встречались *Corynebacterium* sp. oral strain a43s, *Pseudomonas putida, Pseudomonas nitroreducens, S. epidermidis atcc 12228, Bacillus* sp. van12 и *Bacillus cereus*. Для 96,9% микроорганизмов с использованием соответствующих баз данных были установлены только названия родов и семейств. Преобладали бактерии родов *Prevotella* (63,6%), *Dialister* (7,1%), *Veillonella* (7,5%), *Phenylobacterium* (2,1%), *Fingoldia* (3,2%), *Peptoniphilus* (1,2%), *Pseudomonas* (1,9%), *Corynebacterium* (2,5%), *Stenotrophomonas* (0,6%), *Varibaculum* (0,4%), *Megasphaera* (0,4%) и *Mobiluncus* (0,3%).

У пациента № 3 обнаружено 466 различных микроорганизмов, относящихся к одному домену, *Bacteria*, и 10 типам (*Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Planctomycetes, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Synergistetes, Tenericutes, Fibrobacteres, Acidobacteria*). От состава микробиома предыдущего пациента этот состав отличался отсутствием представителей трех таксономических типов — *Chloroflexi, Armatimonadetes* и *Spirochaetae* — и присутствием 2 таксономических типов — *Fibrobacteres* и *Acidobacteria*. Из 466 микроорганизмов только для 100 (21,4%) были установлены названия видов. При этом количество этих 100 видов относительно всех обнаруженных микроорганизмов не превышало 25,3%. Чаще других определялись *Pseudomonas putida, Pseudomonas nitroreducens, Serratia symbiotica, Enterobacter aerogenes, Corynebacterium* sp. oral strain a43s, *Bacillus cereus atcc 10987, Bacillus cereus, Bradyrhizobium* sp. и *Trabulsilla farmer*. Для 74,7% микроорганизмов с использованием соответствующих баз данных были установлены только названия родов и семейств. Наиболее представленными были следующие рода бактерий: *Pseudomonas* (21,4%), *Phenylobacterium* (20,8%), *Stenotrophomonas* (9,1%), *Veillonella* (4,1%), *Bacillus* (3,9%), *Corynebacterium* (3,7%), *Escherichia* и *Shigella* (2,4%), *Dialister* (2,3%), *Bordetella* (2,2%), *Agrobacterium* (2,0%), *Serratia* (1,9%), *Enterobacter* (1,5%), *Prevotella* (0,7%) и *Megasphaera* (0,1%).

Графически результаты таксономического анализа представлены на рис. 2.

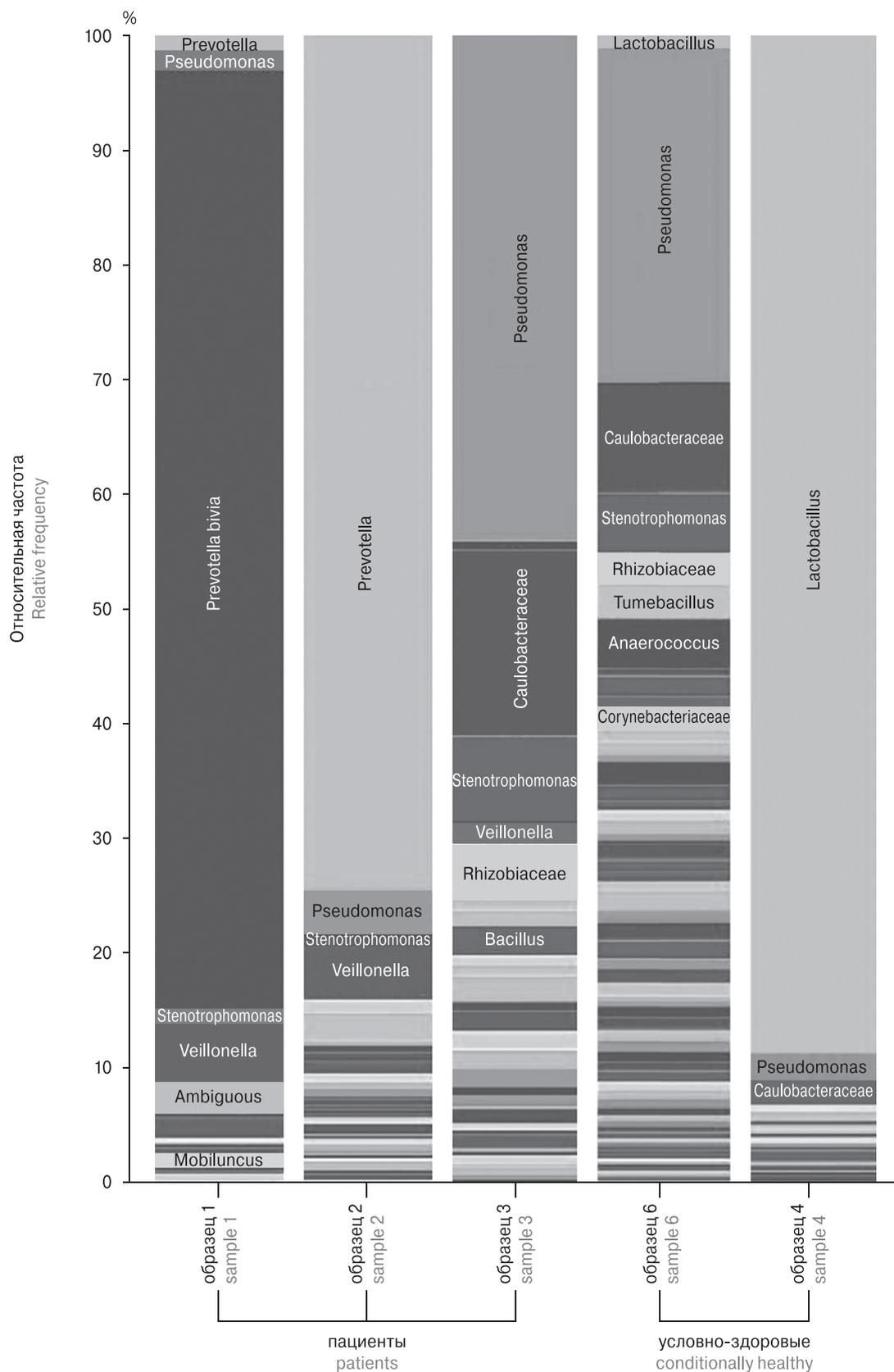
В контрольном образце № 4 обнаружен 331 различных микроорганизм, относящийся к одному домену, *Bacteria*, и 7 типам (*Chloroflexi, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Tenericutes,*

*Bacteroidetes, Cyanobacteria*). Из 331 микроорганизма только для 60 (18,1%) были установлены названия видов. При этом количество этих 60 видов относительно всех обнаруженных микроорганизмов не превышало 4,2%. Преобладали следующие микроорганизмы: *Pediococcus acidilactici, Pseudomonas nitroreducens, Pseudomonas putida, Lactobacillus delbrueckii, Serratia symbiotica, Enterobacter aerogenes, Lactobacillus* sp. kc45b, *Bacillus* sp. van12, *Lactobacillus reuteri, Lactobacillus psittaci, Bacillus cereus atcc 10987, Bacillus cereus* и *S. epidermidis atcc 12228*. Для 95,8% микроорганизмов с использованием соответствующих баз данных были установлены только названия родов и семейств. Наиболее часто встречались представители родов *Lactobacillus* (85,7%), *Pseudomonas* (1,7%), *Phenylobacterium* (1,5%) и *Stenotrophomonas* (1%) (рис. 2).

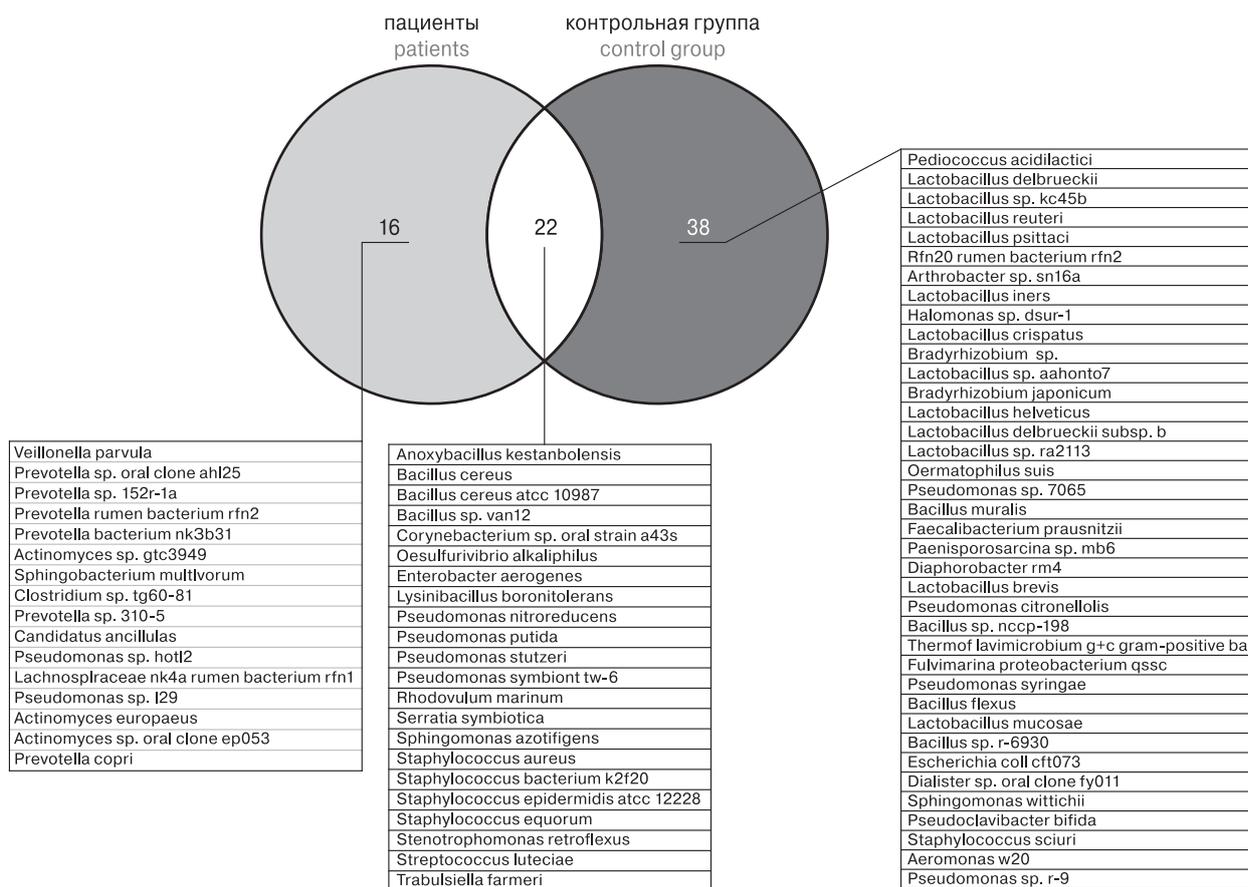
В контрольном образце № 6 обнаружено 794 различных микроорганизма, относящихся к одному домену, *Bacteria*, и 16 типам (*Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Planctomycetes, Lentisphaerae, Synergistetes, Gemmatimonadetes, Tenericutes, Nitrospirae, Deinococcus-Thermus, Cyanobacteria, Epsilonbacteraeota, Chloroflexi, Marinimicrobia (sar406 clade), Armatimonadetes*). Из 794 микроорганизмов только для 154 (19,4%) были установлены названия видов. При этом количество этих 154 видов относительно всех обнаруженных микроорганизмов не превышало 27,7%. Преобладали *Pseudomonas putida, Corynebacterium* sp. oral strain a43s, *Lactobacillus iners, Pseudomonas nitroreducens, Streptococcus luteciae, Campylobacter ureolyticus, Streptococcus gordonii, Bacillus* sp. van12 и *Serratia symbiotica*. Для 72,3% микроорганизмов с использованием соответствующих баз данных были установлены только названия родов и семейств. Чаще других встречались представители следующих родов: *Pseudomonas* (14,2%), *Phenylobacterium* (11,8%), *Alicyclobacillus* (6,4%), *Anaerococcus* (6,4%), *Bacillus* (5,8%), *Stenotrophomonas* (5,6%), *Corynebacterium* (5,4%), *Prevotella* (4,7%), *Streptococcus* (4,2%) и *Lactobacillus* (3,6%) (рис. 2).

Дифференциальные особенности видового состава микробиома в группе пациентов и контрольной группе представлены на рис. 3.

Поскольку видовой состав в исследованных образцах был установлен только для 18,1–21,4% микроорганизмов, статистический анализ проводили на более высоком таксономическом уровне (род микроорганизма). Дискриминантный анализ между группой пациентов и группой условно здоровых мужчин показал, что статистически значимо ( $p < 0,05$ ) отличается представленность только представителей 3 родов микроорганизмов *Prevotella,*

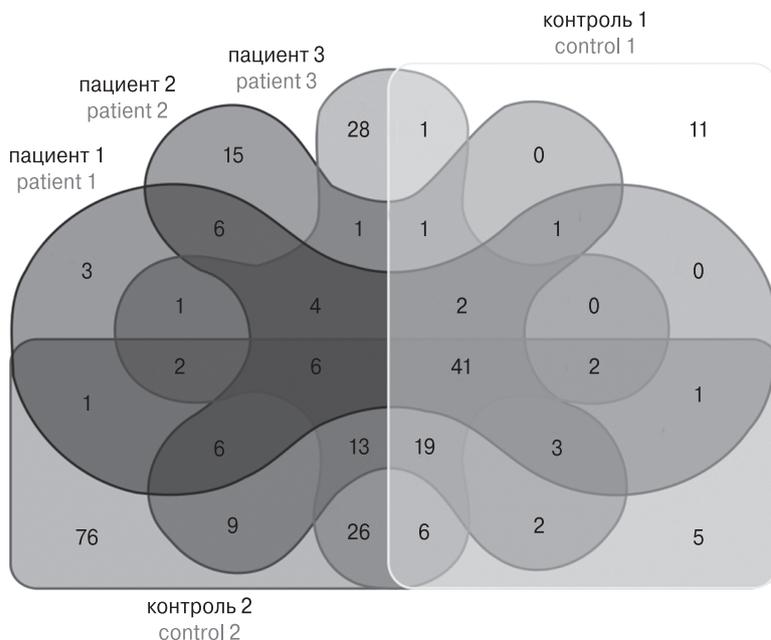


**Рисунок 2. Особенности таксономического состава микробиома уrogenитального тракта у пациентов и контрольной группы**  
 Figure 2. Features of microbiome taxonomic composition of the urogenital tract in patients and the control group



**Рисунок 3. Видовой состав микробиома урогенитального тракта пациентов и контрольной группы (диаграмма Эдвардса–Венна)**

Figure 3. Species composition of the urogenital tract microbiome in patients and control group (Edwards–Venn diagram)



**Рисунок 4. Отличия в таксономическом составе образцов из урогенитального тракта у пациентов с хронической инфекцией и условно здоровых индивидуумов (таксон — род, диаграмма Эдвардса–Венна)**

Figure 4. Differences in the taxonomic composition of samples from the urogenital tract from patients with chronic infection and apparently healthy individuals (taxon — genus, Edwards–Venn diagram)

*Veillonella* и *Megasphaera*. Квадрат расстояния Махаланобиса для двух сравниваемых групп составил 297,3. При этом дискриминантная функция приняла вид  $DF = 0,001x_1 - 0,0097x_2 - 0,029x_3 + 9,16$ , где  $DF$  — значение дискриминантной функции, значения 0,001, 0,0097 и 0,029 —  $b$ -коэффициенты канонической дискриминантной функции,  $x_{1,2,3}$  — численные значения количества представителей родов *Prevotella*,

*Veillonella* и *Megasphaera* соответственно, а значение 9,16 — константа ( $\chi^2 = 7,18$ ;  $p < 0,05$ ).

При сравнении по родовому составу микробиома обнаружены следующие отличия. В группе пациентов обнаружено представителей родов *Prevotella*, *Veillonella* и *Pedobacter* в 16 раз ( $p < 0,05$ ), в 1448 раз ( $p < 0,05$ ) и в 65 раз больше ( $p = 0,06$ ), чем в контрольной группе. У условно здоровых мужчин в отличие от пациентов не обнаружено

**Таблица 2. Отличия в таксономическом составе образцов из урогенитального тракта у пациентов с хронической инфекцией и условно здоровых индивидуумов**

Table 2. Differences in the taxonomic composition of samples from the urogenital tract of patients with chronic infection and apparently healthy individuals

Род Genus	FC	P P-value	Род Genus	FC	P P-value	Род Genus	FC	P P-value
<i>Prevotella</i>	16,76	0,05	<i>Uliginosibacterium</i>	0,53	0,20	<i>Candidatus</i>	0,67	0,40
<i>Veillonella</i>	1448,50	0,01	<i>Luteimonas</i>	0,84	0,44	<i>Ensifer</i>	1,04	0,49
<i>Pedobacter</i>	65,33	0,06	<i>Sphingomonas sp. qss</i>	0,64	0,39	<i>Rhodoplanes</i>	0,28	0,12
Неизвестный род	0,65	0,07	<i>Brachymonas</i>	1,33	0,43	<i>Lactobacillus</i>	0,00	0,23
<i>Pseudomonas</i>	0,82	0,44	<i>Salinarimonas</i>	0,33	0,12	<i>Lachnospiraceae</i>	1,22	0,43
<i>Dialister</i>	5,08	0,20	<i>Pseudoclavibacter</i>	0,48	0,33	<i>Aquabacterium</i>	2,33	0,25
<i>Clostridium</i>	0,50	0,33	<i>Brenneria</i>	1,04	0,49	<i>Oscillospira</i>	0,49	0,32
<i>Fingoldia</i>	3,28	0,24	<i>Aeromonas</i>	1,25	0,43	<i>Microbacterium</i>	0,96	0,48
<i>Corynebacterium</i>	0,76	0,42	<i>Virgibacillus</i>	1,05	0,49	<i>Promicromonospora</i>	2,76	0,16
<i>Stenotrophomonas</i>	0,82	0,44	<i>Cronobacter</i>	0,86	0,46	<i>Sphingobium</i>	1,33	0,41
<i>Alloprevotella</i>	0,51	0,36	<i>Diaphorobacter</i>	4,89	0,24	<i>Phenylobacterium</i>	0,92	0,47
<i>Alicyclobacillus</i>	0,15	0,26	<i>Blautia</i>	0,67	0,40	<i>Anaerococcus</i>	0,07	0,26
<i>Bacillus</i>	0,39	0,30	<i>Thermoflavimicrobium</i>	0,37	0,13	<i>Alcanivorax</i>	0,43	0,33
<i>Enterococcus</i>	1,04	0,47	<i>Amphritea</i>	1,07	0,48	<i>Brevundimonas</i>	0,24	0,29
<i>Tyzzereella 3</i>	3,11	0,12	<i>Arthrobacter</i>	0,04	0,18	<i>Lautropia</i>	1,17	0,45
<i>Ruminococcaceae ucg</i>	0,43	0,32	<i>Undibacterium</i>	2,33	0,32	<i>Mesorhizobium</i>	0,85	0,44
<i>Enterobacter</i>	1,25	0,42	<i>Anaerospira</i>	0,67	0,40	<i>Neptunomonas</i>	6,00	0,15
<i>Gallicola</i>	8,00	0,17	<i>Tolomonas</i>	0,36	0,22	<i>Paenisporosarcina</i>	0,05	0,25
<i>Bd2-13</i>	0,80	0,43	<i>Peredibacter</i>	0,36	0,32	<i>Prevotellaceae ucg-0</i>	0,10	0,27
<i>Peptoniphilus</i>	5,56	0,24	<i>Epulopiscium</i>	0,44	0,34	<i>Actinomycetospora</i>	0,67	0,40
<i>Ochrobactrum</i>	1,03	0,49	<i>Anaerofustis</i>	7,20	0,15	<i>Acinetobacter</i>	0,32	0,26
<i>Staphylococcus</i>	0,60	0,30	<i>Streptococcus</i>	0,01	0,25	<i>Gordonia</i>	0,80	0,44
<i>Trabulsiella</i>	1,11	0,46	<i>Yrc22</i>	70,00	0,21	<i>Shewanella</i>	1,11	0,47
<i>Solibacillus</i>	0,89	0,45	<i>Lysinibacillus</i>	1,12	0,46	<i>Janibacter</i>	1,11	0,47
<i>Serratia</i>	1,00	0,50	<i>Agrobacterium</i>	0,94	0,48	<i>Bifidobacterium</i>	0,67	0,40
<i>Actinomyces</i>	0,63	0,39	<i>Coxiella</i>	0,98	0,49	<i>Arthrospira</i>	1,11	0,47
<i>Escherichia-Shigella</i>	1,12	0,46	<i>Desulfurivibrio</i>	0,76	0,41	<i>Rarobacter</i>	0,67	0,40
<i>Bordetella</i>	0,92	0,47	<i>Leucobacter</i>	0,55	0,34	<i>Sporotomaculum</i>	0,61	0,38
<i>Mogibacterium</i>	42,22	0,17	<i>Abiotrophia</i>	4,00	0,15	<i>Cohnella</i>	0,53	0,24
<i>Achromobacter</i>	0,91	0,47	<i>Rhodobacter</i>	1,18	0,44	<i>Lachnospiraceae ucg</i>	3,07	0,29
<i>Desulfurispora</i>	1,78	0,24	<i>Sphingomonas</i>	1,94	0,31	<i>Novosphingobium</i>	1,49	0,39
<i>Fulvimarina</i>	0,83	0,44	<i>Coprococcus</i>	0,91	0,47	<i>Pantoea</i>	1,39	0,42
<i>Porphyromonas</i>	1,29	0,43	<i>Sanguibacter</i>	0,59	0,18	<i>Proteus</i>	0,91	0,47
<i>Renibacterium</i>	0,09	0,22	<i>Ruminococcaceae</i>	0,48	0,08	<i>Christensenellaceae</i>	0,01	0,25
<i>Erwinia</i>	1,23	0,44	<i>Aneurinibacillus</i>	0,46	0,34	<i>Paracoccus</i>	1,67	0,38
<i>Salibacterium</i>	0,20	0,25	<i>Anoxybacillus</i>	0,09	0,20	<i>Brochothrix</i>	0,83	0,45
<i>Bacteroides</i>	0,84	0,46	<i>Bradyrhizobium</i>	0,66	0,32	<i>Allobaculum</i>	1,33	0,43
<i>Marinobacter</i>	3,33	0,26	<i>Rhodovulum</i>	0,72	0,41	<i>Jannaschia</i>	1,00	0,50
<i>Limnhabitans</i>	0,50	0,32	<i>Comamonas</i>	1,06	0,48	<i>Micrococcus</i>	0,33	0,31
<i>Dermatophilus</i>	1,22	0,38	<i>Citrobacter</i>	1,75	0,33	<i>Dorea</i>	0,18	0,28

представителей рода *Megasphaera*, *Mobiluncus*, *Phormidium*, *Sphingobacterium*, *Temperatibacter*, *Oxobacter*, *Georgenia*, *Actinobaculum*, *Varibaculum*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sediminihabitans*, *Actinobacter*, *Actinoplanes*, *Spirochaeta*, *Enhydrobacter*, *Thermacetogenium*, *Bdellovibrio*, *Oleibacter*, *Porphyromonas*, *Klebsiella*, *Lachnoclostridium*, *Caulobacter*, *Xanthomonas*, *Novispirillum*, *Marvinbryantia*, *Afipia* и *Shinella*. В то же время у пациентов в отличие от условно здоровых мужчин не обнаружено представителей рода *Tepidimonas*, *Faecalibacterium*, *Paludibacterium*, *Aerococcus*, *Campylobacter*, *Pasteurella*, *Rumen*, *Psychrobacter*, *Haemophilus*, *Brevibacillus*, *Sporosarcina*, *Yaniella* и *Lactobacillus*.

Как видно из представленных данных, в образцах групп пациентов и условно здоровых индивидуумов состав микробиоты значительно отличается как по присутствию ряда таксонов (44 рода, рис. 4), так и по уровню их представленности (120 родов, табл. 2), хотя статистически значимые отличия касаются только родов *Prevotella*, *Veillonella* и *Megasphaera*.

## Обсуждение

Развитие метагеномики коренным образом изменило наши возможности характеризовать таксономический состав микробиологических экосистем [13]. Эти достижения позволили определить специфический микробиом, характерный для разных участков тела человека, которые ранее считались стерильными, включая мочевыводящие пути. Выявление определенного микробиома в мочевыводящих путях может иметь важное значение для поддержания здоровья пациентов. Это открывает новую область исследований в урологии, в том числе и с точки зрения будущего дизайна лекарств, нацеленных на определенные микроорганизмы [5].

Механизм развития воспалительного процесса в уретре определяется состоянием ее слизистой. Слизистая оболочка уретры, помимо эпителия, включает собственную ткань слизистой, образованную рыхлой соединительной тканью, богато снабженную кровеносными и лимфатическими сосудами. Противомикробная резистентность слизистой мочеиспускательного канала зависит от ее механической целостности (предотвращает проникновение микроорганизмов с поверхности), выработки достаточного количества слизи клетками секреторного эпителия, пара- и бульбоуретральными железами (обеспечивает механическое смывание микроорганизмов с поверхности уретры) и определенным биохимическим составом уретральной слизи, оказывающей непосредственное противомикробное действие (иммуноглобулины, комплемент и его компоненты, лизоцим и др.).

При нарушении целостности слизистой любого генеза (травма, внедрение микрофлоры) в зоне поражения развивается воспалительная реакция, происходит внедрение микроорганизмов и развитие патологического процесса [2].

По данным ряда авторов, наиболее важным возбудителем инфекций мочеполовых путей продолжает оставаться *E. coli* (примерно 80% случаев заболевания) и *S. saprophyticus* (15% случаев) [2]. Проведенное более 10 лет назад масштабное микробиологическое исследование отделяемого из уретры показало, что основную обсемененность мочеполовых путей составляют представители семейства *Micrococcaceae* — *S. epidermidis* (30%), *S. aureus* (10%), *S. haemolyticus* (5%), а также *Streptococcaceae* — *Enterococcus* spp. (29%), *S. agalactiae* (16%), негемолитический стрептококк (10%),  $\alpha$ -гемолитический стрептококк (7%). Небольшую группу представляют факультативные грамотрицательные палочки, бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, представленные *E. coli* (15%) и *Klebsiella* spp. (1%). Из группы прочих возбудителей высевались *Gardnerella vaginalis*, *Corynebacterium* spp., *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* и *Candida albicans*. Анализируя результаты бактериологического исследования, можно предположить, что в качестве инфекционного агента, ставшего причиной воспаления в уретре, выступали наиболее часто выявляемые микроорганизмы: *Enterococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *E. coli* и *S. aureus* [2].

По данным нашего исследования, состав микробиоты у пациентов и условно здоровых индивидуумов статистически значимо отличался по присутствию/отсутствию рода *Megasphaera* и по уровню представленности родов *Prevotella* и *Veillonella*.

Представители рода *Prevotella* являются членами микробиоты полости рта, влагалища, кишечника и часто ассоциированы с инфекциями дыхательных путей. Они также были выделены при инфекциях мочевыводящих путей, абсцессах головного мозга, остеомиелите и пародонтозе [23, 28]. Представители рода *Veillonella* — это грамотрицательные бактерии, анаэробные кокки, хорошо известные своей способностью к ферментации лактата. У млекопитающих, в том числе у человека, бактерии этого рода являются частью нормальной микрофлоры кишечника и слизистой оболочки полости рта. Однако некоторые виды *Veillonella* могут быть возбудителями раневых и гнойных инфекций. У людей они были обнаружены при остеомиелите и эндокардите [24]. Также представители рода *Veillonella* в норме присутствуют в урогенитальном тракте 5–25% женщин. При этом те же самые виды *Veillonella*, которые в одной ситуации нормально сосуществуют с организмом-хозяином, в другой могут вызывать различные

заболевания человека: синдром раздраженного кишечника, эзофагит, менингит, остеомиелит, пародонтоз и поражения урогенитального тракта [1]. Представители рода *Megasphaera* — грам-отрицательные анаэробные неподвижные коккообразные условно патогенные бактерии, возбудители заболеваний урогенитального тракта человека, в частности бактериального вагиноза. При этом они входят в резидентную микрофлору толстой кишки человека [8].

Важно отметить, что в нашем исследовании у пациентов в отличие от условно здоровых мужчин обнаружена ДНК представителей рода *Megasphaera*, *Mobiluncus*, *Phormidium*, *Sphingobacterium*, *Temperatibacter*, *Oxobacter*, *Georgenia*, *Actinobaculum*, *Varibaculum*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sediminihabitans*, *Actinobacter*, *Actinoplanes*, *Spirochaeta*, *Enhydrobacter*, *Thermacetogenium*, *Bdellovibrio*, *Oleibacter*, *Porphyromonas*, *Klebsiella*, *Lachnoclostridium*, *Caulobacter*, *Xanthomonas*, *Novispirillum*, *Marvinbryantia*, *Afipia* и *Shinella*. Также у пациентов наблюдалось значительно большее количество представителей *Pedobacter*, *Dialister*, *Finegoldia*, *Alloprevotella*, *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Tyzzeraella*, *Gallicola*, *Peptoniphilus*, *Mogibacterium*, *Marinobacter*, *Anaerofustis*, *Abiotrophia*, *Sphingomonas*, *Citrobacter*, *Promicromonospora* и *Neptunomonas* (табл. 2). А вот представленность рода *Enterococcus* была практически одинаковой у пациентов и здоровых индивидуумов. При этом у пациентов было снижено количество представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Renibacterium*, *Salibacterium*, *Limnhabitans*, *Uliginosibacterium*, *Anoxybacillus*, *Anaerococcus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Tolomonas*, *Peredibacter*, *Epulopiscium*, *Micrococcus* и *Dorea*. Представителей *Lactobacillus* у пациентов обнаружено не было. Сравнивая наши данные с данными Кунгурова Н.В. и соавт. [2], точки пересечения можно обнаружить только касательно рода *Klebsiella*.

К настоящему времени многие исследования по таксономическому профилированию уже охарактеризовали микробиом мочи человека. В большинстве этих исследований использовалось 16S-секвенирование для оценки различий таксономического состава между образцами здоровых и больных (табл. 3). Основные таксоны микробиома мочи здоровых мужчин относятся к пяти типам: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* и *Proteobacteria* и часто включают роды *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Staphylococcus* и *Streptococcus*. Во многих исследованиях обнаружен высокий уровень вариативности между людьми по составу микробиома мочи [22].

По данным Moustafa A. и соавт. [21], при анализе метагенома урогенитального тракта (в качестве биоматериала использовали мочу)

среднее количество идентифицированных родов на образец составило 38 (от 6 до 220), при этом у индивидуумов с воспалительными процессами в мочевыводящих путях преобладали представители протеобактерий. По этим же данным у здоровых индивидуумов наиболее часто обнаруживались представители *Actinomyces*, *Anaerococcus*, *Atopobium*, *Facklamia*, *Finegoldia*, *Gardnerella*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*, *Staphylococcus* и *Streptococcus*, а у индивидуумов с воспалительными процессами преобладают *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, а также виды с неясной или неизвестной ролью в инфекции, такие как *Acidovorax*, *Rhodanobacter* и *Oligella*.

Сравнивая данные Moustafa A. и соавт. [21], Neugent M.L. и соавт. [22], Aragon I.M. и соавт. [5], Kim M.S., Jung S.I. [17] и Кунгурова Н.В. и соавт. [2] с нашими данными, можно обнаружить определенное сходство по видовому составу микробиома и доли в нем определенных микроорганизмов. Во-первых, у здоровых индивидуумов во всех исследованиях присутствуют представители *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium* и *Prevotella*. Во-вторых, при сравнении результатов нашего исследования с данными Aragon I.M. и соавт. [5] можно выделить 9 родов, представители которых присутствуют в урогенитальном тракте здоровых мужчин в обоих исследованиях: *Aerococcus*, *Anaerococcus*, *Enterococcus*, *Finegoldia*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Veillonella*. В-третьих, у мужчин с воспалительными процессами в мочевыводящих путях во всех исследованиях присутствуют представители *Klebsiella*, а в нашем исследовании и работе Moustafa A. и соавт. присутствуют представители рода *Citrobacter*. При этом у мужчин с воспалительными процессами в мочевыводящих путях наблюдается снижение типичных представителей родов *Staphylococcus* и *Streptococcus* (табл. 3).

У всех пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, включенных в данное исследование, выявлены дифференциальные отличия состава микробиома по сравнению со здоровыми мужчинами. Изменения в популяции микроорганизмов могут быть результатом повторяющихся или существующих факторов: стресса, диеты, условий окружающей среды. Патологические механизмы заболевания предстательной железы изучены недостаточно. Хроническое воспаление простаты рассматривается как возможная частая причина доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) и хронического простатита (ХП)/синдрома хронической тазовой боли (СХТБ) [17]. Известно, что воспаление предстательной же-

Таблица 3. Состав микробиома урогенитального тракта мужчин

Table 3. The microbiome composition in male urogenital tract

Исследуемая популяция A cohort examined	Основные бактериальные таксоны Main bacterial taxa	Образец Sample	Используемый метод Method used	Ссылка Reference
Здоровые мужчины Healthy males	<i>Lactobacillus</i> , <i>Sneathia</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Ureaplasma</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Gemella</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Fingoldia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Streptococcus</i>	моча urine	16S-секвенирование 16S sequencing	[5]
Мужчины с воспалительными процессами в мочевыводящих путях Males with inflammatory process in urogenital tract	<i>Escherichia</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Ureaplasma</i>	соскоб из уретры urethral scraping	Культуральные методы Culture methods	[2]
Здоровые мужчины Healthy males	<i>Actinomyces</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Facklamia</i> , <i>Fingoldia</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Peptoniphilus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>	моча urine	16S-секвенирование 16S sequencing	[21]
Мужчины с воспалительными процессами в мочевыводящих путях Males with inflammatory process in urogenital tract	<i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Acidovorax</i> , <i>Rhodanobacter</i> , <i>Oligella</i>	моча urine	16S-секвенирование 16S sequencing	[21]
Мужчины с ДГПЖ Males with benign prostatic hyperplasia (BPH)	<i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Klebsiella</i>	моча urine	16S-секвенирование 16S sequencing	[17]
Мужчины с воспалительными процессами в мочевыводящих путях Males with inflammatory process in urogenital tract	<i>Prevotella</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Temperatibacter</i> , <i>Oxobacter</i> , <i>Georgenia</i> , <i>Actinobaculum</i> , <i>Varibaculum</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sediminihabitans</i> , <i>Actinobacter</i> , <i>Actinoplanes</i> , <i>Spirochaeta</i> , <i>Enhydrobacter</i> , <i>Thermacetogenium</i> , <i>Bdellovibrio</i> , <i>Oleibacter</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Lachnoclostridium</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Novispirillum</i> , <i>Marvinbryantia</i> , <i>Afipia</i> , <i>Shinella</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Pedobacter</i> , <i>Dialister</i> , <i>Fingoldia</i> , <i>Alloprevotella</i> , <i>Alicyclobacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Tyzzereella</i> , <i>Gallicola</i> , <i>Peptoniphilus</i> , <i>Mogibacterium</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Anaerofustis</i> , <i>Abiotrophia</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Neptunomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Renibacterium</i> , <i>Salibacterium</i> , <i>Limnhabitans</i> , <i>Uliginosibacterium</i> , <i>Anoxybacillus</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Tolumonas</i> , <i>Peredibacter</i> , <i>Epulopiscium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Dorea</i>	соскоб из уретры urethral scraping	16S-секвенирование 16S sequencing	[данное исследование] current study

## Окончание таблицы 3. Состав микробиома урогенитального тракта мужчин

Table 3. The microbiome composition in male urogenital tract (continued)

Исследуемая популяция A cohort examined	Основные бактериальные таксоны Main bacterial taxa	Образец Sample	Используемый метод Method used	Ссылка Reference
Здоровые мужчины Healthy males	<i>Prevotella</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Tepidimonas</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Paludibacterium</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Rumen</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Sporosarcina</i> , <i>Yaniella</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Pedobacter</i> , <i>Dialister</i> , <i>Finegoldia</i> , <i>Alloprevotella</i> , <i>Alicyclobacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Tyzzerella</i> , <i>Gallicola</i> , <i>Peptoniphilus</i> , <i>Mogibacterium</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Anaerofustis</i> , <i>Abiotrophia</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Renibacterium</i> , <i>Salibacterium</i> , <i>Limnohabitans</i> , <i>Uliginosibacterium</i> , <i>Anoxybacillus</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Tolomonas</i> , <i>Peredibacter</i> , <i>Epulopiscium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Dorea</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Neptunomonas</i>	соскоб из уретры urethral scraping	16S-секвенирование 16S sequencing	[данное исследование] current study

**Примечание.** **St** (жирный шрифт) — сходство результатов других исследований с нашими данными по составу микробиома здоровых индивидуумов. **St** (жирный шрифт с подчеркиванием) — сходство результатов других исследований с нашими данными по составу микробиома у индивидуумов с воспалительными процессами в мочевыводящих путях.

Note. **St** (bold) — similarity of data from other studies with our data on microbiome composition in healthy individuals. **St** (bold underlined) — similarity of other studies with our data on microbiome composition of individuals with urinary tract inflammation.

лезы играет ключевую роль в патогенезе и прогрессировании ДГПЖ, но его причины до конца не изучены. Одна из возможных причин состоит в том, что бактериальная микробиота нижних мочевыводящих путей влияет на местную иммунологическую среду. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы оценить взаимосвязь между микробиотой нижней части мочевыводящих путей у мужчин и простатитом [17]. Используя секвенирование 16S рРНК, Kim M.S. и соавт. сравнили микробиом секрета предстательной железы, семенной жидкости и мочи у пациентов с ДГПЖ и раком простаты и обнаружили, что микробиота различалась в этих двух группах. У пациентов с ДГПЖ обнаружено большее количество представителей родов *Eubacterium* и *Deffluviococcus*, но меньшее содержание *Bacteroidetes*, *Alphaproteobacteria* и *Firmicutes*, а также семейства *Lachnospiraceae* и родов *Propionicimonas*, *Sphingomonas* и *Ochrobactrum* по сравнению с онкологически больными. Эти исследования показывают, что дисбиоз оказывает сильное влияние на заболевание простаты [17].

По данным Shrestha E. и соавт. [25], в образцах злокачественных опухолей простаты выявлены виды *Streptococcus anginosus*, *Anaerococcus lactolyticus*, *Anaerococcus obesiensis*, *Actinobaculum schaalii*, *Varibaculum cambriense* и *Propionimicrobium lymphophilum*. Почти все эти виды известны в качестве возбудителей урогенитальных инфекций,

включая простатит. Также в этой работе показано, что в ряде образцов доброкачественных и злокачественных опухолей предстательной железы преобладали неклассифицированные представители *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* и *Staphylococcaceae*. Mandar R. и соавт. [19], изучая семенную жидкость мужчин с простатитом и здоровых мужчин, используя 16S-секвенирование, показали, что разница между этими двумя группами заключается в снижении относительной численности представителей рода *Lactobacillus* у пациентов с простатитом.

К сожалению, полученные данные не позволяют сделать однозначный вывод о том, какие именно микроорганизмы стали причиной урогенитальной инфекции у пациентов в нашем исследовании. Однако на их основе можно сформировать перечень наиболее вероятных патогенов для трех рассмотренных случаев. Первое место по вероятности занимают неизвестные представители рода *Megasphaera* (результаты дискриминантного анализа, отсутствие у условно здоровых индивидуумов, известный из данных литературы патогенный эффект), далее следуют представители *Prevotella*, *Veillonella* и *Pedobacter* (результаты дискриминантного анализа), а также представители родов *Mobiluncus*, *Phormidium*, *Sphingobacterium*, *Temperatibacter*, *Oxobacter*, *Georgenia*, *Actinobaculum*, *Varibaculum*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sediminihabitans*, *Actinobacter*, *Actinoplanes*, *Spirochaeta*, *Enhydrobacter*,

*Thermacetogenium, Bdellovibrio, Oleibacter, Porphyromonas, Klebsiella, Lachnoclostridium, Caulobacter, Xanthomonas, Novispirillum, Marvinbryantia, Afipia* и *Shinella*.

Безусловно, наблюдаемый у пациентов клинический эффект может быть связан не просто с наличием определенных микроорганизмов, но также и с системным нарушением их конкурентных взаимосвязей (дисбалансом микрофлоры), приводящим к метаболомному нарушению и воспалительным процессам в урогенитальном тракте. Так, в нашей работе и исследованиях других авторов для индивидуумов с хроническим воспалительным процессом показано снижение количества типичных представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus* и увеличение численности родов *Klebsiella* и *Citrobacter*. Дальнейшие исследования в этом направлении должны расширить представления о нормофлоре урогенитального тракта и ее нарушении, а также расширить перечень вероятных патогенных микроорганизмов — возбудителей инфекций урогенитального тракта.

## Заключение

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить таксономическое многообразие микроорганизмов, относящихся к домену *Bacteria*, в образцах из урогенитального

тракта, а также установить дифференциальные различия, касающиеся представителей родов *Megasphaera*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Pedobacter*, *Mobiluncus*, *Phormidium*, *Sphingobacterium*, *Temperatibacter*, *Oxobacter*, *Georgenia*, *Actinobaculum*, *Variabaculum*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sedimihabitans*, *Actinobacter*, *Actinoplanes*, *Spirochaeta*, *Enhydrobacter*, *Thermacetogenium*, *Bdellovibrio*, *Oleibacter*, *Porphyromonas*, *Klebsiella*, *Lachnoclostridium*, *Caulobacter*, *Xanthomonas*, *Novispirillum*, *Marvinbryantia*, *Afipia*, *Shinella*, *Tepidimonas*, *Faecalibacterium*, *Paludibacterium*, *Aerococcus*, *Campylobacter*, *Pasteurella*, *Rumen*, *Psychrobacter*, *Haemophilus*, *Brevibacillus*, *Sporosarcina*, *Yaniella* и *Lactobacillus* из образцов, полученных от больных с хроническими воспалительными процессами и от условно здоровых индивидуумов. Наблюдаемый у пациентов клинический эффект может быть связан с дисбалансом микрофлоры — снижением типичных представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus* и увеличением численности представителей родов *Klebsiella* и *Citrobacter*. Это может приводить к метаболомным нарушениям и воспалительным процессам в урогенитальном тракте.

Работа выполнена при поддержке ООО «Эльген» (конкурс научных проектов «Инновация»), включившей проведение генетического исследования методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina HiSeq 3000.

## Список литературы/References

1. Карпеева Ю.С., Новикова В.П., Хавкин А.И., Ковтун Т.А., Макаркин Д.В., Федотова О.Б. Микробиота и болезни человека: возможности диетической коррекции. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2020. Т. 65, № 5. С. 116–125. [Karpееva Yu.S., Novikova V.P., Khavkin A.I., Kovtun T.A., Makarkin D.V., Fedotova O.B. Microbiota and human diseases: dietary correction. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii* = *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2020, vol. 65, no. 5, pp. 116–125. (In Russ.)] doi: 10.21508/1027-4065-2020-65-5-116-125
2. Кунгуров Н.В., Герасимова Н.М., Горбунов А.П., Скидан Н.И., Щербаклова Н.В., Евстигнеева Н.П., Чигвинцева Е.А., Юровских Л.И., Тамбулова В.Н. Условно-патогенная микрофлора урогенитального тракта у мужчин с воспалительными заболеваниями мочеиспускательного канала. Вестник последиplomного медицинского образования. 2010. № 2. С. 26–32. [Kungurov N.V., Gerasimova N.M., Gorbunov A.P., Skidan N.I., Shcherbakova N.V., Evstigneeva N.P., Chigvintseva E.A., Yurovskikh L.I., Tambulova V.N. Conditionally pathogenic microflora of the urogenital tract in men with inflammatory diseases of the urethra. *Vestnik poslediplomnogo meditsinskogo obrazovaniya* = *Bulletin of Postgraduate Medical Education*, 2010, no. 2, pp. 26–32. (In Russ.)]
3. Ткачук В.Н. Хронический простатит. М.: Медицина для всех, 2006. 112 с. [Tkachuk V.N. Chronic prostatitis. M.: *Meditsina dlya vsekh*, 2006. 112 p. (In Russ.)]
4. Anderson-Otunu O., Akhtar S. Chronic infections of the urinary tract and bladder cancer risk: a systematic review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2016, vol. 17, no. 8, pp. 3805–3807.
5. Aragón I.M., Herrera-Imbroda B., Queipo-Ortuño M.I., Castillo E., Del Moral J.S., Gómez-Millán J., Yucel G., Lara M.F. The urinary tract microbiome in health and disease. *Eur. Urol. Focus*, 2018, vol. 4, no. 1, pp. 128–138. doi: 10.1016/j.euf.2016.11.001
6. Bates S.T., Berg-Lyons D., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J.*, 2010, vol. 5, pp. 908–917.
7. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, no. 15, pp. 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
8. Bordigoni A., Lo C.I., Yimagou E.K., Diop K., Nicaise B., Raoult D., Desnues C., Fenollar F. *Megasphaera vaginalis* sp. nov. and *Anaerococcus vaginimassiliensis* sp. nov., new bacteria isolated from vagina of French woman with bacterial vaginosis. *New Microbes New Infect.*, 2020, vol. 37: 100706. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100706
9. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.*, 2010, vol. 7, no. 5, pp. 335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303

10. Drewes J.L., White J.R., Dejea C.M., Fathi P., Iyadorai T., Vadivelu J., Roslani A.C., Wick E.C., Mongodin E.F., Loke M.F., Thulasi K., Gan H.M., Goh K.L., Chong H.Y., Kumar S., Wanyiri J.W., Sears C.L. High-resolution bacterial 16S rRNA gene profile meta-analysis and biofilm status reveal common colorectal cancer consortia. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2017, vol. 3: 34. doi: 10.1038/s41522-017-0040-3
11. Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 2011, vol. 27, no. 16, pp. 2194–2200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381
12. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*, 2014, vol. 2, no. 1: 6. doi: 10.1186/2049-2618-2-6
13. Gilbert J.A., Blaser M.J., Caporaso J.G., Jansson J.K., Lynch S.V., Knight R. Current understanding of the human microbiome. *Nat. Med.*, 2018, vol. 24, no. 4, pp. 392–400. doi: 10.1038/nm.4517
14. Huang C.H., Chou Y.H., Yeh H.W., Huang J.Y., Yang S.F., Yeh C.B. Risk of cancer after lower urinary tract infection: a population-based cohort study. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2019, vol. 16, no. 3: 390. doi: 10.3390/ijerph16030390
15. Jackobson S.H., Eklof O., Eriksson C.G., Lins L.E., Tidgren B., Winberg J. Development of hypertension and uremia after pyelonephritis in childhood: 27 year follow up. *BMJ*, 1989, vol. 299, no. 6701, pp. 703–706. doi: 10.1136/bmj.299.6701.703
16. Jensen E.A., Berryman D.E., Murphy E.R., Carroll R.K., Busken J., List E.O., Broach W.H. Heterogeneity spacers in 16S rDNA primers improve analysis of mouse gut microbiomes via greater nucleotide diversity. *Biotechniques*, 2019, vol. 67, no. 2, pp. 55–62. doi: 10.2144/btn-2019-0025
17. Kim M.S., Jung S.I. The urinary tract microbiome in male genitourinary diseases: focusing on benign prostate hyperplasia and lower urinary tract symptoms. *Int. Neurourol. J.*, 2021, vol. 25, no. 1, pp. 3–11. doi: 10.5213/inj.2040174.087
18. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*, 2012, vol. 9, no. 4, pp. 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923
19. Mändar R., Punab M., Korrovits P., Türk S., Ausmees K., Lapp E., Preem J.K., Oopkaup K., Salumets A., Truu J. Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int. J. Urol.*, 2017, vol. 24, no. 3, pp. 211–216. doi: 10.1111/iju.13286
20. Masajtis-Zagajewska A., Nowicki M. New markers of urinary tract infection. *Clin. Chim. Acta*, 2017, vol. 471, pp. 286–291. doi: 10.1016/j.cca.2017.06.003
21. Moustafa A., Li W., Singh H., Moncera K.J., Torralba M.G., Yu Y., Manuel O., Biggs W., Venter J.C., Nelson K.E., Pieper R., Telenti A. Microbial metagenome of urinary tract infection. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1: 4333. doi: 10.1038/s41598-018-22660-8
22. Neugent M.L., Hulyalkar N.V., Nguyen V.H., Zimmermann P.E., De Nisco N.J. Advances in understanding the human urinary microbiome and its potential role in urinary tract infection. *mBio*, 2020, vol. 11, no. 2: e00218-20. doi: 10.1128/mBio.00218-20
23. Randis T.M., Ratner A.J. Gardnerella and Prevotella: co-conspirators in the pathogenesis of bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.*, 2019, vol. 220, no. 7, pp. 1085–1088. doi: 10.1093/infdis/jiy705
24. Scheiman J., Luber J.M., Chavkin T.A., MacDonald T., Tung A., Pham L.-D., Wibowo M.C., Wurth R.C., Punthambaker S., Tierney B.T., Yang Z., Hattab M.W., Avila-Pacheco J., Clish C.B., Lessard S., Church G.M., Kostic A.D. Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nat. Med.*, 2019, vol. 25, no. 7, pp. 1104–1109. doi: 10.1038/s41591-019-0485-4
25. Shrestha E., White J.R., Yu S.H., Kulac I., Ertunc O., De Marzo A.M., Yegnasubramanian S., Mangold L.A., Partin A.W., Sfanos K.S. Profiling the urinary microbiome in men with positive versus negative biopsies for prostate Cancer. *J. Urol.*, 2018, vol. 199, no. 1, pp. 161–171. doi: 10.1016/j.juro.2017.08.001
26. Steen A.D., Crits-Christoph A., Carini P., DeAngelis K.M., Fierer N., Lloyd K.G., Thrash J.C. High proportions of bacteria and archaea across most biomes remain uncultured. *ISME J.*, 2019, vol. 13, pp. 3126–3130.
27. Srinivasan S., Chambers L.C., Tapia K.A., Hoffman N.G., Munch M.M., Morgan J.L., Domogala D., Lowens M.S., Proll S., Huang M.-L., Soge O.O., Jerome K.R., Golden M.R., Hughes J.P., Fredricks D.N., Manhart L.E. Urethral microbiota in men: association of Haemophilus influenzae and mycoplasma penetrans with nongonococcal urethritis. *Clin. Infect. Dis.*, 2021, vol. 73, no. 7, pp. e1684–e1693. doi: 10.1093/cid/ciaa1123
28. Tanaka S., Yoshida M., Murakami Y., Ogiwara T., Shoji M., Kobayashi S., Watanabe S., Machino M., Fujisawa S. The relationship of Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens and Prevotella melaninogenica in the supragingival plaque of children, caries and oral malodor. *J. Clin. Pediatr. Dent.*, 2008, vol. 32, no. 3, pp. 195–200. doi: 10.17796/jcpd.32.3.vp65717781561811
29. Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, no. 16, pp. 5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07

**Автор:**

**Кутилин Д.С.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия.

**Author:**

**Kutilin D.S.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, National Medical Research Oncology Center, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.03.2021  
Отправлена на доработку 31.07.2021  
Принята к печати 12.09.2021

Received 30.03.2021  
Revision received 31.07.2021  
Accepted 12.09.2021

# ОСОБЕННОСТИ ЭФФЕКТОРНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМОЙ ПРИ АКТИВАЦИИ И ХРОНИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Н.В. Балацкая, С.В. Саакян, Е.Б. Мякошина, И.Г. Куликова, Г.И. Кричевская

ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия

**Резюме.** Цель исследования — сравнительный анализ содержания эффекторных субпопуляций лимфоцитов крови пациентов с увеальной меланомой при активации и хроническом течении герпесвирусной инфекции. В исследовании приняли участие 70 больных с увеальной меланомой, 38 пациентов с язвами роговицы и вовлечением увеального тракта и 33 здоровых донора — всего 141 человек. Иммунофенотипирование проводили методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием системы моноклональных антител для дифференцировки субпопуляций лимфоцитов. IgM- и IgG-антитела к герпесвирусным инфекциям определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа на автоматическом ИФА-анализаторе Lazurite (Dunex Technologies Inc., США) с диагностическими наборами ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Результаты продемонстрировали, что абсолютное количество лимфоцитов (CD45<sup>+</sup>) в крови у пациентов с увеальной меланомой не отличалось от показателей у здоровых доноров, а у пациентов с язвами роговицы с вовлечением увеального тракта отмечалось повышение показателя. Выявлено снижение относительного и абсолютного содержания Т-клеток (CD3<sup>+</sup>) при увеальной меланоме и, напротив, увеличение абсолютного содержания CD3<sup>+</sup> при воспалении. Не наблюдалось разницы в относительном и абсолютном содержании субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-хелперов/индукторов при активации герпесвирусных инфекций при опухолях. При язвах роговицы установлено достоверное увеличение абсолютного содержания CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-хелперов/индукторов. При хронической герпесвирусной инфекции выявлено повышение относительного и абсолютного числа цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) при увеальной меланоме. При активном инфицировании регистрировали снижение относительного числа Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) при опухолях, при воспалении — увеличение абсолютного и уменьшение относительного содержания по сравнению с нормой. «Дубль-позитивные» Т-клетки при опухолях и воспалении увеличивались. В-лимфоциты (CD19<sup>+</sup>) при меланоме и воспалении увеличивались. Относительное число натуральных киллеров (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) крови при увеальной меланоме повышалось при активации инфекции. При воспалении выявлено снижение относительного содержания натуральных киллеров (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). При меланоме не выявлено изменений индекса соотношения CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, при воспалении отмечено его увеличение при остром и хроническом инфицировании герпесвирусными инфекциями.

**Адрес для переписки:**

Мякошина Елена Борисовна  
105062, Россия, Москва, ул. Садовая-Черногрязская, 14/19,  
ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца.  
Тел.: 8 916 196-90-30.  
E-mail: myakoshina@mail.ru

**Contacts:**

Elena B. Myakoshina  
105062, Russian Federation, Moscow, Sadovaya-  
Chernogryazskaya str., 14/19, Moscow Helmholtz Research  
Centre of Eye Diseases.  
Phone: +7 916 196-90-30.  
E-mail: myakoshina@mail.ru

**Для цитирования:**

Балацкая Н.В., Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Куликова И.Г.,  
Кричевская Г.И. Особенности эффекторных субпопуляций лимфоцитов  
у пациентов с увеальной меланомой при активации и хроническом  
течении герпесвирусной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2021.  
Т. 11, № 6. С. 1123–1130. doi: 10.15789/2220-7619-FOE-1596

**Citation:**

Balatskaya N.V., Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Kulikova I.G.,  
Krichevskaya G.I. Features of effector lymphocyte subsets in patients with  
uveal melanoma in recurrent and chronic herpesvirus infection // Russian  
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6,  
pp. 1123–1130. doi: 10.15789/2220-7619-FOE-1596

( $p < 0,05$ ). Выявлено угнетение иммунной системы при увеальной меланоме, не позволяющее активировать противовирусную защиту. Полученные результаты представляются важными для разработки персонализированных подходов к прогнозу и лечению пациентов с увеальной меланомой.

**Ключевые слова:** увеальная меланома, язва роговицы с вовлечением увеального тракта, субпопуляции лимфоцитов, герпесвирусная инфекция, иммунофенотипирование, иммунитет.

## FEATURES OF EFFECTOR LYMPHOCYTE SUBSETS IN PATIENTS WITH UVEAL MELANOMA IN RECURRENT AND CHRONIC HERPESVIRUS INFECTION

Balatskaya N.V., Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Kulikova I.G., Krichevskaya G.I.

Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the study is to conduct a comparative analysis of percentages for peripheral blood effector lymphocyte subsets in patients with uveal melanoma manifested by recurrent and chronic herpesvirus infection. There were 141 subjects enrolled: 70 patients with uveal melanoma, 38 patients with corneal ulcers and involvement of the uveal tract as well as 33 healthy donors. Immunophenotyping was performed by using laser flow cytometry with panel of monoclonal antibodies to differentiate lymphocyte subpopulations. IgM and IgG antibodies to herpesvirus infections were determined by using enzyme-linked immunosorbent assay on an automatic ELISA analyzer Lazurit (USA) with diagnostic kits of CJSC “Vector-Best” (Koltsovo). The data obtained showed that the absolute number of blood lymphocytes ( $CD45^+$ ) in patients with uveal melanoma did not differ from those in healthy donors. In contrast, patients with corneal ulcers and involvement of the uveal tract had this parameter increased. A decreased relative and absolute count of T cells ( $CD3^+$ ) in uveal melanoma, but increased absolute  $CD3^+$  number in inflammation was observed. No difference in relative and absolute content of the  $CD3^+CD4^+$  helper/inducer subpopulation in patients with recurrent herpesvirus infections was found. Corneal ulcers in cancer patients revealed significantly increased absolute level of  $CD3^+CD4^+$  helpers/inductor cells. Chronic herpesvirus infection in uveal melanoma patients showed increased relative and absolute number of cytotoxic T lymphocytes ( $CD3^+CD8^+$ ). Recurrent herpesvirus infection was featured with decreased relative number of T lymphocytes ( $CD3^+CD8^+$ ), upon inflammation, there was noted increased absolute and decreased relative number compared with healthy subjects. Double positive T cells increased in tumor and inflammation. B lymphocytes ( $CD19^+$ ) increased in melanoma and inflammation. The relative number of blood natural killer cells ( $CD16^+CD56^+$ ) in uveal melanoma increased upon recurrent infection. Inflammation was coupled to decreased relative level of natural killer cells ( $CD16^+CD56^+$ ). Melanoma showed no changes in  $CD4^+/CD8^+$  ratio; upon inflammation, its increase was noted in acute and chronic herpesvirus infections ( $p < 0.05$ ). The suppression of the immune system in uveal melanoma, restricting antiviral defense, was revealed. The data obtained seem to be important for development of personalized approaches to prognosis and treatment of patients with uveal melanoma.

**Key words:** uveal melanoma, corneal ulcer with uveal tract involvement, lymphocyte subsets, herpesvirus infection, immunophenotyping, immunity.

## Введение

Иммунные реакции организма на внедрение антигенов различного генеза включают в себя активацию эффекторных Т-клеток, а также регуляторных Т-лимфоцитов, направленных на элиминацию определенного вида антигенов и в некоторых случаях ограничивающих влияние эффекторных Т-лимфоцитов [13].

Повышение уровня относительного показателя некоторых субпопуляций лимфоцитов крови (цитотоксических (ЦТЛ) —  $CD3^+CD8^+$ ) может свидетельствовать о гиперактивности иммунитета при острых вирусных, бактериальных и обострении хронических инфекций [12, 18].

В настоящее время исследователи активно занимаются выявлением взаимосвязей разных субпопуляции лимфоцитов при активации вирусных инфекций [4, 12, 18]. Так, установлено, что вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) оказывает влияние на В-лимфоциты, что в свою очередь приводит к активации  $CD8^+$  ЦТЛ, в том числе и субпопуляции  $CD8^+CD28^-$  Treg, и иммун-

ному дисбалансу [29]. Последние работы доказывают участие  $CD4^+CD25^+$  Treg в развитии ВИЧ-инфекции [3].  $CD4^+$  Т-клетки фенотипа Th1 и  $CD8^+$  Т-клетки участвуют в защитном иммунитете при инфицировании *Mycobacterium tuberculosis* [7]. Различные субпопуляции лимфоцитов — ЕКТ (Т-клетки с маркерами ЕК),  $CD4^+$  Th2,  $CD8^+$  Т-клетки,  $\gamma\delta$ Т-клетки и  $CD4^+CD25^+$  Treg — задействованы при сепсисе и подавляют при этом иммунные реакции организма [28].

При опухолях также отмечен дисбаланс субпопуляционного состава лимфоцитов [5]. Увеличение количества регуляторных Т-клеток (с фенотипом  $CD3^+CD8^+$ ), снижение натуральных киллеров (НК-клеток) наблюдают при прогрессии кожной меланомы [17].

Офтальмотропные возбудители хронических персистирующих инфекций (в частности, герпесвирусы) участвуют в этиопатогенезе ряда заболеваний [8], в том числе и онкологических процессов в тканях глаза (например, при лимфоме) [6, 23]. Онкомодулирующая роль указанных возбудителей заключается в регуляции ви-

русами функций иммунокомпетентных клеток и перепрограммировании их в направлении большей прогрессии опухолевого роста.

Увеальная меланома (УМ) — злокачественная опухоль сосудистой оболочки, склонная к метастазированию [2, 14]. Возникновение, рост новообразований напрямую или опосредованно связаны с иммунным дисбалансом в организме [24, 25]. Нами ранее изучалась частота выявления ДНК различных герпесвирусов и *Chlamydia trachomatis* в плазме крови, стекловидном теле, ткани УМ и уровень антител к перечисленным возбудителям в сыворотке крови. При средних и больших УМ выявлены антитела, свидетельствующие о реактивации ВЭБ. При анализе биоптата веретенноклеточной АВ-формы УМ отмечено повышение уровня ДНК *C. trachomatis* в сочетании с ДНК ВЭБ и ЦМВ [11].

До настоящего времени качественный и количественный состав эффекторных субпопуляций лимфоцитов крови у пациентов с УМ при активации и хроническом течении герпесвирусной инфекции остается малоизученным и требует дальнейшего исследования.

Цель работы — провести сравнительный анализ содержания эффекторных субпопуляций лимфоцитов крови пациентов с УМ при активации и хроническом течении герпесвирусной инфекции.

## Материалы и методы

Всего в обследование были включены 70 больных с УМ, 38 пациентов с неопухолевым поражением увеального тракта (с язвами роговицы с вовлечением увеального тракта) и 33 здоровых донора — всего 141 человек. Средний возраст исследуемых составил  $54,9 \pm 11,1$  года. Каждому пациенту было проведено клинико-инструментальное обследование и подтвержден диагноз УМ.

В классификации J. Shields [14] УМ разделяют на 3 группы. В соответствии с этой классификацией и были распределены исследуемые пациенты.

Обследовано 37 больных с опухолями малого размера (с проминенцией до 3 мм, диаметром основания до 10 мм), 22 пациента с опухолями среднего размера (с проминенцией 3,1–5 мм, диаметром основания 10,1–15 мм) и 11 человек с меланомами больших размеров (с проминенцией > 5,1 мм, диаметром основания > 15,1 мм) (рис., А, Б, В, II обложка).

Группу контроля составили здоровые доноры с хроническими герпесвирусными инфекциями ( $n = 33$ ), группу сравнения — пациенты с язвами роговицы и воспалительным поражением сосудистой оболочки ( $n = 38$ ).

Пробы цельной крови взяты из локтевой вены натощак с 08:00 до 09:00 с помощью вакуумных систем в пробирки Vacuette® с антикоагулянтом К3ЭДТА.

Иммунофенотипирование выполняли методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием системы моноклональных антител Multitest 6-Color TBNK Reagent в пробирках BD TruCount (Becton Dickinson, США) в цитометре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США).

Лизис эритроцитов и фиксацию лейкоцитов выполняли за счет лизирующего раствора BD FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson, США). Содержание лимфоцитов определяли в программе Canto (Becton Dickinson, США), при этом выделяли анализируемый регион по общей популяции, экспрессирующей CD45<sup>+</sup>-антиген, и по гранулярности клеток (CD45<sup>+</sup>PerCP-Cy5,5\*/SSC). Применяли меченые флуорохромами антитела к CD3<sup>+</sup>(FITC), CD4<sup>+</sup>(PE-Cy7\*), CD8<sup>+</sup>(APC-CY7\*), CD16<sup>+</sup>/56<sup>+</sup>(PE), CD19<sup>+</sup>(APC\*), что давало возможность провести дифференцировку Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>), Т-цитотоксических (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) и Т-дубль позитивных клеток (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), NK-клеток (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>).

Инфекционный статус у всех обследованных определяли путем обнаружения офтальмотропных возбудителей с выявлением в сыворотке крови маркеров хронической и активной фазы инфекций. Характер серологического ответа показывал инфицированность и фазу инфекции с учетом класса иммуноглобулинов (табл. 1).

IgM-антитела к структурным антигенам возбудителей и IgG-антитела к неструктурным (ранним) антигенам герпесвирусов — маркеры, соответственно, активной первичной или реактивации хронической инфекции — определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на автоматическом ИФА-анализаторе Lazurite (Dy nex Technologies Inc., США) с диагностическими наборами ЗАО «Вектор-Бест» (Россия).

Использован программный комплекс Professional BioStat версии 2009 для Windows. Методы статистики — t-критерий Стьюдента, критерий Фишера и  $\chi^2$ , статистическая значимость —  $p < 0,05$ .

## Результаты

Абсолютное количество лимфоцитов (CD45<sup>+</sup>) крови у пациентов с меланомой, независимо от наличия активной (в среднем  $2,0 \pm 0,08 \times 10^9$ /л) или хронической (в среднем  $2,0 \pm 0,2 \times 10^9$ /л) герпесвирусной инфекции, не отличалось от значений, выявленных у здо-

ровых доноров (в среднем  $2,06 \pm 0,11 \times 10^9/\text{л}$ ). В то же время у пациентов с язвами роговицы с вовлечением увеального тракта отмечали достоверное повышение показателя по сравнению со здоровыми донорами, независимо от активации ( $2,6 \pm 0,19 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,05$ ) или хронического ( $2,7 \pm 0,3 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,05$ ) персистенции герпесвирусной инфекции (табл. 2).

Средние значения общей популяции Т-клеток ( $CD3^+$ ) показали снижение относительного (до  $70,9 \pm 1,2\%$ ) и абсолютного (до  $1,4 \pm 0,07 \times 10^9/\text{л}$ ) ее содержания у больных с меланомой при активации герпесвирусной инфекции и хроническом ее течении по сравнению со здоровыми донорами ( $73,1 \pm 0,87\%$  и  $1,51 \pm 0,08 \times 10^9/\text{л}$ ;  $p > 0,05$ ). При этом нами отмечено достоверное увеличение абсолютного содержания  $CD3^+$  как при активной ( $1,96 \pm 0,15 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,05$ ), так и при хронической герпесвирусной инфекции

( $2,01 \pm 0,2 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,05$ ) у пациентов с воспалительным поражением роговицы и увеального тракта по сравнению со здоровыми пациентами.

В отношении субпопуляции  $CD3^+CD4^+$ -хелперов/индукторов не отмечали разницу как в относительном, так и в абсолютном их числе независимо от активации герпесвирусных инфекций у больных с УМ по сравнению со здоровыми пациентами. В то же время при анализе данных показателей при язвах роговицы с вовлечением увеального тракта отмечено достоверное увеличение абсолютного содержания  $CD3^+CD4^+$ -хелперов/индукторов как при активной ( $1,3 \pm 0,1 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,05$ ), так и при хронической ( $1,4 \pm 0,18 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,05$ ) инфекции. Кроме того, у больных с УМ выявляли увеличение и относительного показателя при остром ( $49,5 \pm 1,7\%$ ,  $p > 0,05$ ) и хроническом инфицировании ( $52,1 \pm 2,1\%$ ,  $p < 0,05$ ) по сравнению со здоровыми пациентами ( $45,7 \pm 1,19\%$ ).

Интересные показатели отмечены в отношении цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD8^+$ ): только при наличии у больных хронической герпесвирусной инфекции выявлено повышение относительного и абсолютного их числа ( $27,7 \pm 1,6\%$  и  $0,6 \pm 0,07 \times 10^9/\text{л}$  соответственно;  $p > 0,05$ ) при УМ по сравнению со здоровыми донорами ( $25,6 \pm 1,04\%$  и  $0,52 \pm 0,03 \times 10^9/\text{л}$  соответственно). При активном инфицировании отмечали небольшое снижение относительного числа Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD8^+$ ) при УМ ( $24,2 \pm 0,9\%$ ,  $p > 0,05$ ), сопоставляя с показателями здоровых людей. При язвах роговицы с вовлечением увеального тракта определяли некоторое увеличение абсолютного содержания как при активации герпесвирусных инфекций ( $0,63 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p > 0,05$ ), так и при хроническом инфицировании ( $0,56 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p > 0,05$ ) и уменьшение относительного содержания по сравнению с нормой.

При анализе уровней дубль-позитивных Т-клеток при УМ отмечено увеличение их относительных и абсолютных показателей как при хроническом, так и при активном инфицировании герпесвирусами. Достоверная разница у больных выявлена в отношении повышения относительного содержания  $CD3^+CD4^+CD8^+$ -лимфоцитов ( $1,2 \pm 0,13\%$ ,  $p < 0,05$ ) при активации герпесвирусных инфекций и абсолютного показателя при хроническом инфицировании ( $0,03 \pm 0,007 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p > 0,05$ ) по сравнению со здоровыми донорами. Те же тенденции отмечали и при воспалительных заболеваниях глаз.

Анализ содержания в крови В-лимфоцитов ( $CD19^+$ ) у больных с УМ показал достоверное повышение абсолютного числа как при активации ( $0,3 \pm 0,01 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,05$ ), так и при хроническом течении ( $0,3 \pm 0,03 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,05$ ) герпесвирусной инфекции по сравнению со здоровыми до-

**Таблица 1. Серологические маркеры хронической и активной герпесвирусной инфекции**

Table 1. Serological markers of chronic and active herpes virus infection

Возбудитель Pathogen	Антитела в сыворотке крови Antibodies in serum
<b>Вирус простого герпеса 1, 2 типа (ВПГ)</b> Herpes simplex virus type 1, 2 (HSV)	<b>ВПГ-IgG к поздним* антигенам</b> HSV-IgG to late* antigens
	<b>ВПГ-IgM к поздним антигенам</b> HSV-IgM to late antigens
<b>Вирус простого герпеса 1 типа (ВПГ 1)</b> Herpes simplex virus type 1 (HSV 1)	<b>IgG к ранним** антигенам</b> IgG to early** antigens
<b>Вирус простого герпеса 2 типа (ВПГ 2)</b> Herpes simplex virus type 2 (HSV 1)	<b>IgG к ранним антигенам</b> IgG to early antigens
<b>Цитомегаловирус (ЦМВ)</b> Cytomegalovirus (CMV)	<b>IgG к поздним антигенам</b> IgG to late antigens
	<b>IgM к поздним антигенам</b> IgM to late antigens
	<b>IgG к ранним антигенам</b> IgG to early antigens
<b>Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ)</b> Epstein-Barr virus (EBV)	<b>IgG к ядерному антигену</b> IgG to nuclear antigen
	<b>IgG к раннему антигену</b> IgG to early antigen
	<b>IgM к капсидному антигену</b> IgM capsid antigen
<b>Вирус герпеса 6 типа</b> Herpes virus type 6	<b>IgG</b>
	<b>IgM</b>

**Примечание.** \* — поздние (структурные) антигены, \*\* — ранние (неструктурные) антигены.

Note. \* — late (structural) antigens, \*\* — early (non-structural) antigens.

норами ( $0,24 \pm 0,02 \times 10^9/\text{л}$ ). При анализе показателей абсолютного и относительного содержания В-лимфоцитов ( $\text{CD}19^+$ ) при язвах роговицы с вовлечением увеального тракта выявлено достоверное их повышение независимо от активации инфекции или хронического инфицирования.

Относительное число натуральных киллеров ( $\text{CD}16^+\text{CD}56^+$ ) крови у больных с УМ достоверно повышалось при активации инфекции и составило  $17,3 \pm 1,2\%$ ,  $p < 0,05$  по сравнению с таковым у здоровых доноров ( $14 \pm 0,87\%$ ). Повышение относительного числа НК-клеток ( $18,5 \pm 1,8\%$ ) наблюдалось при меланоме малых размеров и активной инфекции, а также у больных с опухолями средних размеров при хроническом инфицировании ( $16,5 \pm 1,8\%$ ). Однако при УМ больших размеров указанный показа-

тель вновь определялся в границах нормы, как при активации инфекции, так и при хроническом ее течении.

При воспалительных заболеваниях глаз обнаружено, напротив, снижение относительного содержания натуральных киллеров ( $\text{CD}16^+\text{CD}56^+$ ) как при хроническом инфицировании ( $7,8 \pm 1,5\%$ ,  $p < 0,05$ ), так и при активной герпесвирусной инфекции ( $8,9 \pm 1,2\%$ ,  $p < 0,05$ ).

При УМ не выявлено достоверных изменений индекса соотношения  $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ , тогда как при язвенных поражениях роговицы с вовлечением увеального тракта отмечено достоверное его увеличение при остром ( $3,1 \pm 0,74$ ,  $p < 0,05$ ) и хроническом ( $2,6 \pm 0,4$ ,  $p < 0,05$ ) инфицировании герпесвирусными инфекциями по сравнению с показателями здоровых доноров.

**Таблица 2. Субпопуляционный состав лимфоцитов при увеальной меланоме и язве роговицы с вовлечением увеального тракта по сравнению с показателями здоровых доноров**

Table 2. The lymphocyte subset composition in uveal melanoma and corneal ulcer involving the uveal tract compared with healthy donors

Показатель Factors		Контрольная группа Control group (n = 33)	Группы/Groups			
			Язва роговицы с вовлечением увеального тракта Corneal ulcer involving the uveal tract		Увеальная меланнома Uveal melanoma	
			активация activation (n = 26)	хроническая chronic (n = 12)	активация activation (n = 50)	хроническая chronic (n = 20)
Лимфоциты $\text{CD}45^+$ Lymphocytes $\text{CD}45^+$	$\times 10^9/\text{л}$ $\times 10^9/\text{l}$	$2,06 \pm 0,11$	$2,6 \pm 0,19^*$	$2,7 \pm 0,3^*$	$2,0 \pm 0,08$	$2,0 \pm 0,2$
Т-лимфоциты (общая популяция) $\text{CD}3^+$ T-lymphocytes (bulk population) $\text{CD}3^+$	% $\times 10^9/\text{л}$ $\times 10^9/\text{l}$	$73,1 \pm 0,87$	$75,3 \pm 1,4$	$75,5 \pm 1,8$	$70,9 \pm 1,2$	$72,4 \pm 1,2$
Т-хелперы $\text{CD}3^+\text{CD}4^+$ T helpers $\text{CD}3^+\text{CD}4^+$	% $\times 10^9/\text{л}$ $\times 10^9/\text{l}$	$45,7 \pm 1,19$	$49,5 \pm 1,7$	$52,1 \pm 2,1^*$	$45,8 \pm 1,3$	$43,4 \pm 1,8$
Т-цитотоксические $\text{CD}3^+\text{CD}8^+$ Cytotoxic T cells $\text{CD}3^+\text{CD}8^+$	% $\times 10^9/\text{л}$ $\times 10^9/\text{l}$	$25,6 \pm 1,04$	$24,4 \pm 1,4$	$22,1 \pm 1,7$	$24,2 \pm 0,9$	$27,7 \pm 1,6$
Т-двух-позитивные лимфоциты $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{CD}8^+$ Double positive lymphocytes $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{CD}8^+$	% $\times 10^9/\text{л}$ $\times 10^9/\text{l}$	$0,54 \pm 0,31$	$0,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,13^*$	$1,2 \pm 0,27$
В-лимфоциты $\text{CD}19^+$ B lymphocytes $\text{CD}19^+$	% $\times 10^9/\text{л}$ $\times 10^9/\text{l}$	$12,8 \pm 0,63$	$15,2 \pm 1,1^*$	$16,3 \pm 1,4^*$	$11,3 \pm 0,6$	$12,4 \pm 0,7$
Натуральные киллеры $\text{CD}16^+\text{CD}56^+$ Natural killers $\text{CD}16^+\text{CD}56^+$	% $\times 10^9/\text{л}$ $\times 10^9/\text{l}$	$14 \pm 0,87$	$8,9 \pm 1,2^*$	$7,8 \pm 1,5^*$	$17,3 \pm 1,2^*$	$14,7 \pm 1,2$
$\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$	расчетн. единица unit of account	$1,95 \pm 0,12$	$3,1 \pm 0,74^*$	$2,6 \pm 0,4^*$	$2,0 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2$

Примечание. \* — достоверность различия параметров у больных исследуемых групп по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ).

Note. \* — significance of differences in parameters in patients of the studied groups compared with the control group ( $p < 0,05$ ).

## Обсуждение

Последние десятилетия ознаменовались активным поиском этиологических и патофизиологических аспектов возникновения злокачественных опухолей [11]. Помимо молекулярно-генетических исследований, проведены работы, указывающие и на иммунный дисбаланс при новообразованиях, и на связь возникновения опухолей с вирусными инфекциями [7, 10]. Уvealная меланома — опухоль сосудистой оболочки, сопровождающаяся развитием метастатической болезни и разнонаправленными иммунными сдвигами [2]. Подтверждением иммуногенности УМ является появление отдаленного метастазирования после энуклеации [19].

Уже в конце прошлого века отмечали изменения иммунной системы при УМ по типу повышенной чувствительности замедленного типа [26]. Кроме того, получены подтверждения присутствия в строме опухоли опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов, макрофагов и других иммунокомпетентных клеток в ответ на появление клеток УМ в организме и срабатывания эффекторных иммунных механизмов [22]. Инфильтрация ткани меланомы CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетками оказывает прямое цитотоксическое действие на клетки опухоли [27]. Наличие в ткани меланомы макрофагов CD68<sup>+</sup> подтверждено [15], хотя их значимость для витального прогноза разноречива [21].

При меланоме сосудистой оболочки выявили отклонение клеток субпопуляций Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> и индекса соотношения CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> от нормы, что свидетельствовало, по мнению авторов, о метастатической болезни [9].

На определенной стадии опухолевого роста может устанавливаться равновесие между новообразованием и иммунной системой человека, однако влияние вирусной инфекции вызывает срыв противоопухолевой защиты и ведет к экспансии опухолевых клеток [6].

Проведенный нами сравнительный анализ динамики эффекторных субпопуляций лимфо-

цитов у пациентов с УМ при активации и хроническом течении герпесвирусной инфекции показал отсутствие значимых сдвигов лимфоцитов, общей популяции Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов. Это позволяет сделать предположение об угнетении иммунной системы организма больных, не позволяющем активировать противовирусную защиту.

Однако у пациентов с меланомой диагностировано достоверное увеличение абсолютного числа Т-дубль-позитивных лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> при активации герпесвирусной инфекции и относительного — при хроническом инфицировании. По данным литературы, повышение абсолютного и относительного числа дубль-позитивных клеток выявляют также и при меланоме кожи [16].

Наши исследования показали увеличение относительного числа натуральных киллеров (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) при активации вирусной инфекции у больных с УМ. При различных онкологических заболеваниях изменение содержания НК-клеток может служить прогностическим критерием метастазирования и уменьшения показателей общей выживаемости [1].

В то же время исследование аналогичных показателей при воспалительных заболеваниях увеального тракта показало достоверные сдвиги по сравнению со значениями, выявленными у здоровых доноров, свидетельствующие о нормальном иммунном реагировании организма на внедрение чужеродных агентов.

Следовательно, результаты проведенных нами исследований позволяют предположить глубокое угнетение иммунной системы организма пациентов с УМ, не позволяющее активировать противовирусную защиту. Тем не менее очевидно, что УМ вызывает разнонаправленные сдвиги в относительном и абсолютном содержании лимфоцитов при активации герпесвирусных инфекций и хроническом инфицировании ими. Полученные результаты дают повод для разработки новых стратегий лечения УМ и анализа факторов прогноза.

## Список литературы/References

1. Абакушина Е.В., Кузьмина Е.Г., Коваленко Е.И. Основные свойства и функции НК-клеток человека // Иммунология. 2012. Т. 33, № 4. С. 220–224. [Abakushina E.V., Kuzmina E.G., Kovalenko E.I. The main characteristics of human natural killer cells. *Immunologiya = Immunologiya*, 2012, vol. 33, no. 4, pp. 220–224. (In Russ.)]
2. Бровкина А.Ф., Панова И.Е., Саакян С.В. Офтальмоонкология: новое за последние два десятилетия // Вестник офтальмологии. 2014. Т. 130, № 6. С. 13–19. [Brovkina A.F., Panova I.E., Saakyan S.V. Ophthalmic oncology: new in the last two decades. *Vestnik oftal'mologii = Bulletin of Ophthalmology*, 2014, vol. 130, no. 6, pp. 13–19. (In Russ.)]
3. Воробьев А.А., Быковская С.Н., Пашков Е.П., Быков А.С. Роль клеток-регуляторов CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> в развитии хронических инфекционных заболеваний // Вестник РАМН. 2006. № 9–10. С. 24–29. [Vorob'ev A.A., Bykovskaya S.N., Pashkov E.P. The role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells in the development of chronic infectious diseases. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Herald of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2006, no. 9–10, pp. 24–29. (In Russ.)]
4. Железникова Г.Ф. Регуляторные Т-лимфоциты в иммунном ответе на инфекцию // Журнал инфектологии. 2011. Т. 3, № 1. С. 6–13. [Zheleznikova G.F. Regulatory T-lymphocytes in the immune response to infection. *Zhurnal Infektologii = Journal Infectology*, 2011, vol. 3, no. 1, pp. 6–13. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2011-3-1-6-13

5. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н., Короткова О.В., Славина Е.Г., Борунова А.А. Новые возможности регуляции противоопухолевого иммунного ответа // Злокачественные опухоли. 2015. Т. 1. С. 24–30. [Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Zabolina T.N., Korotkova O.V., Slavina E.G., Borunova A.A. New possibilities for regulating the antitumor immune response. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors*, 2015, vol. 1, pp. 24–30. (In Russ.)] doi: 10.18027/2224-5057-2015-1-24-30
6. Кричевская Г.И., Слепова О.С., Саакян С.В., Мякошина Е.Б. Влияние герпесвирусных инфекций на уровень сывороточного интерферона-альфа и интерферона-гамма у пациентов с начальной меланомой хориоидеи // Российский офтальмологический журнал. 2014. Т. 7, № 2. С. 28–32. [Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Saakyan S.V., Myakoshina E.B. The effect of herpes virus infections on the level of serum interferon-alpha and interferon-gamma in patients with initial melanoma of the choroid. *Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2014, vol. 7, no. 2, pp. 28–32. (In Russ.)] doi: 10.18008/1816-5095-2019-1S-40-44
7. Кричевская Г.И., Слепова О.С., Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Андреева Т.А., Андришин А.Е., Хорошилова И.П., Захарова Г.П., Майбогин А.М., Трухина А.В. К вопросу о роли вирусов герпеса человека в патогенезе опухолей орбиты и глаза: детекция вирусной ДНК в биоптатах опухолей. Российский офтальмологический журнал // 2016. Т. 2. С. 42–47. [Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Andreeva T.A., Andryushin A.E., Khoroshilova I.P., Zakharova G.P., Maybogin A.M., Trukhina A.V. On the role of human herpes viruses in the pathogenesis of tumors of the orbit and eye: detection of viral DNA in tumor biopsy specimens. *Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2016, vol. 2, pp. 42–47. (In Russ.)] doi: 10.21516/2072-0076-2016-9-2-42-46
8. Нероев В.В., Катаргина Л.А., Ковалева Л.А., Кричевская Г.И., Балацкая Н.В. Клинические аспекты бактериальной язвы роговицы затяжного течения, роль вирусов герпеса в ее патогенезе, тактика лечения // Офтальмология. 2019. Т. 16 (1S). С. 40–44. [Neroev V.V., Katargina L.A., Kovaleva L.A., Krichevskaya G.I., Balatskaya N.V. Clinical aspects of a prolonged course of a corneal ulcer, the role of herpes viruses in its pathogenesis, treatment tactics. *Oftal'mologiya = Ophthalmology*, 2019, vol. 16 (1S), pp. 40–44. (In Russ.)] doi: 10.18008/1816-5095-2019-1S-40-44
9. Патент № 2147373 Российская Федерация, МПК G01N33/53 (1998.06). Способ выявления скрытого метастазирования при увеальной меланоме: № 98111889/14; заявлено 19.06.1998; опубликовано 10.04.2000 / Лихванцева В.Г., Бровкина А.Ф., Гусев Г.А., Юровская Н.Н. Патентообладатель: Московский НИИ глазных болезней имени Гельмгольца. 9 с. [Patent No. 2147373 Russian Federation, Int. Cl. G01N33/53 (1998.06). Method of revealing latent metastatic spread in patients with uveal melanoma. No. 98111889/14; application: 19.06.1998; date of publication 10.04.2000 / Likhvantseva V.G., Brovkina A.F., Gusev G.A., Jurovskaja N.N. Proprietors: Moskovskij NIИ glaznykh boleznej imeni Gel'mgol'tsa. 9 p.]
10. Саакян С.В., Амирян А.Г., Цыганков А.Ю., Скларова Н.В., Залетаев Д.В. Клинические, патоморфологические и молекулярно-генетические особенности увеальной меланомы с высоким риском метастазирования // Российский офтальмологический журнал. 2015. Т. 8, № 2. С. 47–52. [Saakyan S.V., Amiryani A.G., Tsygankov A.Yu., Sklyarova N.V., Zaletaev D.V. Clinical, pathomorphological and molecular genetic characteristics of uveal melanoma with a high risk of metastasis. *Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2015, vol. 8, no. 2, pp. 47–52. (In Russ.)]
11. Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Кричевская Г.И., Слепова О.С., Пантелеева О.Г., Андришин А.С., Хорошилова-Маслова И.П., Захарова Г.П. Обследование больных увеальной меланомой на наличие герпесвирусных инфекций // Вопросы вирусологии. 2016. Т. 61, № 6. С. 284–287. [Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Panteleeva O.G., Andryushin A.S., Khoroshilova-Maslova I.P., Zakharova G.P. Examination of patients with uveal melanoma for the presence of herpes virus infection. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2016, vol. 61, no. 6, pp. 284–287. (In Russ.)] doi: 10.18821/0507-4088-2016-61-6-284-287
12. Сорокина М.Н., Скрипченко Н.В. Вирусные энцефалиты и менингиты у детей. М.: Медицина, 2004. 416 с. [Sorokina M.N., Skripchenko N.V. Viral encephalitis and meningitis in children. Moscow: Medicine, 2004. 416 p. (In Russ.)]
13. Bronkhorst I.H.G., Vu T.H.K., Jordanova E.S., Luyten G.P.M., van der Burg S.H., Jager M.J. Different subsets of tumor-infiltrating lymphocytes correlate with macrophage influx and monosomy 3 in uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2012, vol. 53, pp. 5370–5378. doi: 10.1167/iovs.11-9280
14. Carvajal R.D., Schwartz G.K., Tezel T.H., Marr B., Francis J.H., Nathan P.D. Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects. *Br. J. Ophthalmol.*, 2017, vol. 101, pp. 38–44. doi: 10.1136/bjophthalmol-2016-309034
15. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Histopathologic characteristics of uveal melanomas in eyes enucleated from the Collaborative Ocular Melanoma Study. *Am. J. Ophthalmol.*, 1998, vol. 125, pp. 745–766. doi: 10.1016/S0002-9394(98)00040-3
16. Desfrancois J., Moreau-Aubry A., Vignard V., Godet Y., Khammari A., Dréno B., Jotereau F., Gervois N. Double positive CD4CD8 alpha beta T cells: a new tumor-reactive population in human melanomas. *PLoS*, 2010, vol. 5: e8437. doi: 10.1371/journal.pone.0008437
17. Houghton A.N., Gold J.S., Blachere N.E. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr. Opin. Immunol.*, 2001, vol. 13, pp. 134–140. doi: 10.1016/s0952-7915(00)00195-3
18. Kawamura K., Kadowaki N., Kitawaki T., Uchiyama T. Virus-stimulated plasmacytoid dendritic cells induce CD4<sup>+</sup> cytotoxic regulatory T cells. *Blood*, 2006, vol. 107, no. 3, pp. 1031–1038. doi: 10.1182/blood-2005-04-1737
19. Lambert S.R., Char D.H., Howes E.J., Crawford J.B., Wells J. Spontaneous regression of a choroidal melanoma. *Arch. Ophthalmol.*, 1986, vol. 104, pp. 732–734. doi: 10.1038/sj.eye.6702071
20. Li L., Wu C. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells inhibit human memory  $\gamma\delta$ T cells to produce IFN- $\gamma$  in response to Mycobacterium tuberculosis antigen ESAT-6. *Blood*, 2008, vol. 111, no. 12, pp. 5629–5636. doi: 10.1182/blood-2008-02-139899
21. Mantovani A. Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines. *Lab. Invest.*, 1994, vol. 71, pp. 5–16.
22. Mantovani A., Romero P., Palucka A.K., Marincola F.M. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the micro-environment. *Lancet*, 2008, vol. 371, no. 9614, pp. 771–783. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60241-X
23. Moore P.S., Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat. Rev. Cancer*, 2010, vol. 10, no. 12, pp. 878–889. doi: 10.1038/nrc2961

24. Niederkorn J.Y. Immune escape mechanisms of intraocular tumors. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2009, vol. 28, pp. 329–347. doi: 10.1016/j.preteyeres.2009.06.002
25. Oliva M., Rullan A.J., Piulats J.M. Uveal melanoma as a target for immune-therapy. *Ann. Transl. Med.*, 2016, vol. 4, no. 9: 172. doi: 10.21037/atm.2016.05.04
26. Priluck I.A., Robertson D.H., Pritchard P.J., Ilstrup D.M. Immune responsiveness in patients with choroidal malignant melanoma. *Am. S. Ophthalmol.*, 1979, vol. 87, pp. 215–220. doi: 10.1016/0002-9394(79)90146-6
27. Tobal K., Deuble K., McCartney A., Lightman S. Characterization of cellular infiltration in choroidal melanoma. *Melanoma Res.*, 1993, vol. 3, pp. 63–65.
28. Wisnoski N., Chung C.-S., Chen Y., Huang X., Ayala A. The contribution of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-regulatory cells to immune suppression in sepsis. *Shock*, 2007, vol. 27, no. 3, pp. 251–257. doi: 10.1097/01.shk.0000239780.33398.e4
29. Zu Y.L., Li C., Ma Z., Li D., Fu X. Roles of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T regulatory cells in acute infectious mononucleosis in children. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2007, vol. 45, no. 3, pp. 208–211.

---

**Авторы:**

**Балацкая Н.В.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник, начальник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия;  
**Саакян С.В.**, д.м.н., профессор, начальник отдела офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия;  
**Мякошина Е.Б.**, к.м.н., старший научный сотрудник отдела офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия;  
**Куликова И.Г.**, старший научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия;  
**Кричевская Г.И.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия.

**Authors:**

**Balatskaya N.V.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Department of Immunology and Virology, Head of the Department of Immunology and Virology, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;  
**Saakyan S.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Ophthalmooncology and Radiology, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;  
**Myakoshina E.B.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Ophthalmology and Radiology, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;  
**Kulikova I.G.**, Senior Researcher, Department of Immunology and Virology, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;  
**Krichevskaya G.I.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Department of Immunology and Virology, Moscow, Russian Federation.

---

Поступила в редакцию 09.09.2020  
Принята к печати 10.01.2021

Received 09.09.2020  
Accepted 10.01.2021

# PREVALENCE OF HEPATITIS B AND C VIRAL MARKERS AMONG APPARENTLY HEALTHY RESIDENTS OF THE SOCIALIST REPUBLIC OF VIETNAM (SOUTHERN VIETNAM)

Yu.V. Ostankova<sup>a</sup>, A.V. Semenov<sup>b</sup>, E.B. Zueva<sup>a</sup>, E.N. Serikova<sup>a</sup>, A.N. Schemele<sup>a</sup>,  
D.E. Valutite<sup>a</sup>, H.K.T. Huynh<sup>c</sup>, S.A. Egorova<sup>a</sup>, Areg A. Totolian<sup>a</sup>

<sup>a</sup> St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections of SRC VB Vector of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>c</sup> Ho Chi Minh Pasteur Institute, Ho Chi Minh City, Vietnam

**Abstract.** The aim of this study was to assess the prevalence of serological and molecular biological markers of viral hepatitis B and C among apparently healthy residents of the Southern Vietnam. The study material was represented by 397 blood serum samples collected from apparently healthy residents of the Southern Vietnam. The ELISA examination for presence of HBV and HCV markers involved HBsAg, anti-HBs IgG, anti-HBcore IgG, and anti-HCV qualitative determination. For HBV DNA and HCV RNA detection, nucleic acids were extracted from serum blood, and a test for virus detection was carried out by real-time PCR with hybridization fluorescence detection. Amplification and subsequent sequencing of HBV and HCV were performed using nested PCR with paired overlapping primers jointly flanking the target regions. Analysis of the overall prevalence of serological markers showed that among the apparently healthy individuals anti-HBsAg and anti-HCV antibodies were detected in 12.3% (95% CI: 9.27–15.99%) and 3.27% (95% CI: 1.76–5.53%) of individuals, respectively. The prevalence of HBsAg in men (19.1%) significantly exceeded that of found in women (5.9%),  $\chi^2 = 14.688$  with  $p = 0.0001$ ,  $df = 1$ , calculated odds ratio  $OR = 3.751$  (95% CI: 1.892–7.439). Among apparently healthy patients, taking into account HBsAg-positive and negative samples, HBV DNA was detected in 26.95% (95% CI: 22.65–31.6%). HBV phylogenetic analysis showed that subtype B4 prevalence comprised 64.49%. Subtypes C1 (14.95%), B2 (9.35%), C2 (6.54%), C3 (0.93%), and C5 (3.74%) were also identified. HCV RNA was detected in 7 samples, which accounted for 1.76% (95% CI: 0.71–3.6%). Phylogenetic analysis showed that all HCV isolates belong to genotype 6, subtype 6a (100%).

**Key words:** HBV, HCV, viral hepatitis markers, molecular epidemiology, genotype, apparently healthy residents, Southern Vietnam.

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МАРКЕРОВ ВИРУСОВ ГЕПАТИТА В И С СРЕДИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЖИТЕЛЕЙ ЮЖНОГО РЕГИОНА СОЦИАЛИСТИЧЕСКОЙ РЕСПУБЛИКИ ВЬЕТНАМ

Останкова Ю.В.<sup>1</sup>, Семенов А.В.<sup>2</sup>, Зуева Е.Б.<sup>1</sup>, Серикова Е.Н.<sup>1</sup>, Щемелев А.Н.<sup>1</sup>, Валутите Д.Э.<sup>1</sup>,  
Хуйнх Х.К.Т.<sup>3</sup>, Егорова С.А.<sup>1</sup>, Тотолян Арег А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия

<sup>3</sup> Институт имени Пастера в г. Хошимин, г. Хошимин, Вьетнам

**Резюме.** Целью нашего исследования было оценить распространенность серологических и молекулярно-биологических маркеров вирусных гепатитов В и С среди условно здоровых жителей Южного Вьетнама. Материал

### Адрес для переписки:

Останкова Юлия Владимировна  
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,  
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.  
Тел.: 8 (812) 233-20-92. E-mail: shenna1@yandex.ru

### Contacts:

Yuliia V. Ostankova  
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,  
St. Petersburg Pasteur Institute.  
Phone: +7 (812) 233-20-92. E-mail: shenna1@yandex.ru

### Для цитирования:

Останкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н.,  
Щемелев А.Н., Валутите Д.Э., Хуйнх Х.К.Т., Егорова С.А., Тотолян Арег А.  
Распространенность маркеров вирусов гепатита В и С среди условно  
здоровых жителей южного региона Социалистической Республики  
Вьетнам // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1131–1140.  
doi: 10.15789/2220-7619-ТРО-1793

### Citation:

Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Serikova E.N., Schemele A.N.,  
Valutite D.E., Huynh H.K.T., Egorova S.A., Totolian Areg A. prevalence of hepatitis B  
and C viral markers among apparently healthy residents of the Socialist Republic  
of Vietnam (Southern Vietnam) // Russian Journal of Infection and Immunity =  
Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1131–1140. doi: 10.15789/2220-  
7619-ТРО-1793

исследования — 397 образцов плазмы крови условно здоровых жителей Южного Вьетнама. Исследование ИФА на наличие маркеров ВГВ и ВГС включало определение HBsAg, anti-HBs IgG, anti-HBscore IgG и качественное определение anti-HCV. Для обнаружения ДНК ВГВ и РНК ВГС нуклеиновые кислоты выделяли из плазмы крови и проводили тест на присутствие вирусов с помощью ПЦР в реальном времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Амплификацию и последующее секвенирование ВГВ и ВГС проводили с использованием вложенной ПЦР с парными перекрывающимися праймерами, совместно фланкирующими целевые регионы. Анализ общей распространенности серологических маркеров показал, что среди условно здоровых лиц HBsAg и антитела к ВГС были обнаружены в 12,3% (95% ДИ: 9,27–15,99%) и 3,27% (95% ДИ: 1,76–5,53%) случаев соответственно. Распространенность HBsAg у мужчин (19,1%) значительно превышала таковую у женщин (5,9%),  $\chi^2 = 14,688$ ,  $p = 0,0001$ ,  $df = 1$ , рассчитанное отношение шансов  $OR = 3,751$  (95% ДИ: 1,892–7,439). Среди условно здоровых пациентов с учетом HBsAg-положительных и отрицательных проб ДНК ВГВ была выявлена у 26,95% (95% ДИ: 22,65–31,6%). Филогенетический анализ ВГВ показал, что распространенность подтипа В4 составляет 64,49%, также были выявлены подтипы С1 (14,95%), В2 (9,35%), С2 (6,54%), С3 (0,93%) и С5 (3,74%). РНК ВГС была обнаружена в 7 образцах, что составило 1,76% (95% ДИ: 0,71–3,6%). Филогенетический анализ показал, что все изоляты ВГС относятся к генотипу 6, подтипу 6а (100%).

**Ключевые слова:** ВГВ, ВГС, маркеры вирусных гепатитов, молекулярная эпидемиология, генотипы, условно здоровые жители, Южный Вьетнам.

## Introduction

Hepatotropic viruses, which cause chronic liver diseases, remain one of the most serious public health concerns in the world. Viral hepatitis is the seventh leading cause of death worldwide, and approximately 47 and 48% of these deaths are associated with the hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV), respectively. According to preliminary calculations, the cumulative deaths from viral hepatitis in the period from 2015 to 2030 could be approximately 20 million [35].

The epidemiology of viral hepatitis is a dynamic phenomenon subject to change due to socioeconomic development, the development of socio-cultural practices, community activities carried out within the framework of national programs, and the development of hepatitis virus awareness. Currently, great strides have been made in the understanding of viral hepatitis, and ideas about chronic and acute forms of diseases caused by hepatotropic viruses have changed. Methods have appeared that help identify viruses in the early stages or in latent forms of the disease. Antiviral drugs and effective vaccines have been developed against some viruses.

HBV and HCV are found all over the world, and their prevalence differs depending on the geographic region. The worst affected regions with high rates of chronic HBV and HCV infection are in Africa, especially Sub-Saharan Africa, Central Asia, and East Asia. Depending on the country, infections may be concentrated in certain population groups (for example, injecting drug users [IDU]).

HBV and HCV belong to parenteral-transmitted infections, which means that virus is transmitted via blood and/or other body fluids upon the condition of skin or mucosal damage. Natural infection routes include sexual transmission (direct sexual contacts), vertical (mother-to-child transmission during or after birth, as well as germinal infection), domestic

contacts (direct and indirect including use of common hygiene items with an infected person, etc.). Artificial routes include IDU infection when using infected materials, via medical procedures with the use of HBV- or HCV-contaminated tools, blood and blood product transfusion, etc. [34]. The transmission of HBV can be blocked by vaccination, while it is not available for HCV. The progression of liver diseases associated with parenteral viral hepatitis can be prevented by long-term suppression of viral activity with effective drugs [16].

Either pathogen can lead to both acute and chronic liver disease, and in either case, during the acute stage of infection, most people do not experience any symptoms [1]. According to global statistics, around 15–45% of HCV-infected people can spontaneously clear the virus within 6 months after infection, without any treatment. The other 55–85% of people develop CHC [15]. CHB is very common in infants infected from their mothers, or before the age of 5, when the likelihood of progressing from acute hepatitis B (AHB) to chronic hepatitis is more than 90%. Infection developing at an adult age leads to chronic hepatitis in less than 5% of cases [37].

The clinical course of infection depends on several factors, including the age at the time of infection, gender, ethnicity, host genetic factors, and immune status. Viral genotype, subtype, and genomic variability of the virus are also significant factors [31, 36]. HBV and HCV are genetically heterogeneous. HBV is subdivided into 10 genotypes (A–J) and more than 40 subtypes differing in nucleotide sequence composition [25]. HCV is classified into seven genotypes (1–7); genotypes 1–4 and 6 are subdivided into a variable number of closely related subtypes (more than 100 subtypes have now been described) [28].

HBV and HCV determinations (genotype, subtype) are crucial for a better understanding of epidemiological and virological particularities, including agent characteristics. Further, this provides addition-

al information for decision making on antiviral therapy strategies. The genotypes and subtypes of viruses differ significantly concerning the natural course of infection, pathogenesis, modes of transmission, disease progression, treatment regimens, responses to antiviral therapy, and clinical outcome [5, 30].

It should be noted that the methods of HBV and HCV detection, as well as the diagnostics of the associated liver diseases in middle and low-income countries, differ fundamentally from those that are used in countries with access to high-cost technologies requiring special-purpose equipment and skilled personnel. Most of the related tests are limited to the detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to the hepatitis C virus (anti-HCV IgG), while molecular and genetic methods providing a more accurate assessment of virus prevalence are available only in core laboratories in big cities [22]. Data on the prevalence of HBV and HCV markers in a population are bounded, as tests are frequently limited to certain groups of population — risk groups (HIV-infected people, prisoners, IDU, etc.) and groups where the prevalence of infection has a substantial impact on the health of the population (blood donors, pregnant women).

The primary global health sector strategy on viral hepatitis places particular focus on hepatitis B and C, owing to the relative public health burden they represent [35]. One of the tasks required to follow this strategy is to estimate the prevalence of HBV and HCV among conventionally healthy people.

Vietnam is currently one of the countries with the highest mortality rates from liver cancer associated mainly with HBV and HCV infections [9]. Vietnam is amongst the 20 countries with the highest burden of HCV in the world. In Vietnam, the prevalence of HCV infection varies depending on the geographical location and the target population. The prevalence of anti-HCV IgG antibodies among the population is 1.0–4.7%, but is substantially higher among at-risk groups [18]. The prevalence of chronic HBV infection, as measured by the hepatitis B surface antigen (HBsAg) prevalence, is 8–20% in the general population and 31–54% in the high-risk urban population in Vietnam [11]. Predictive and model studies have predicted approximately 8 million chronic HBV cases and 58 600 HBV-related liver cancers in Vietnam by 2025, and an estimated annual HBV-related mortality rate of 20 000 per year by 2025 [20].

The aim of this study was to assess the prevalence of serological and molecular biological markers of viral hepatitis B and C among conditionally healthy residents of South Vietnam.

## Materials and methods

The study material was represented by 397 blood serum samples collected from conditionally healthy residents of the Southern Vietnam. The examined

persons denied HBV or HCV infection anamnesis. The local ethics committee approved the study. All the patients gave written informed consent to participate in the study.

The ELISA examination for HBV and HCV markers occurrence involved HBsAg, anti-HBs IgG, anti-HBcore IgG, and anti-HCV qualitative determination (test-systems by Vector-Best, Diagnostic Systems RPC) in compliance with the manufacturer's manuals.

For primary HBV DNA and HCV RNA detection, nucleic acids were extracted from blood serum using AmpliPrime Ribo-Prep commercial kit (CRIE, Moscow). Virus presence test was executed by real-time polymerase chain reaction (PCR) with hybridization fluorescence detection using AmpliSens® HCV/HBV/HIV-FL commercial kit (CRIE, Moscow).

Further, for HBV DNA detection, a PCR-based method developed by the St. Petersburg Pasteur Institute under the Rospotrebnadzor was used which allows to detect low HBV DNA concentrations in various clinical materials and use amplified products for sequence analysis, with sensitivity of 5 ME/ml [4]. Therewith, HBV amplification was performed involving nested-PCR according to the Taormina Occult HBV Consensus recommendation [26]. In the first stage, asymmetric PCR with extended oligonucleotides was performed, and at the second stage, to increase the sensitivity, PCR was performed using the amplification product of the first reaction, wherein one of the nested pairs overlapping primers jointly flanking the complete HBV genome (S, P, C, X genes) [3]. The nucleotide sequences of the 18 complete HBV genomes were deposited in the international GenBank database under the numbers MZ671234–MZ671251.

For HCV RNA analysis, the next stage included a reverse transcription reaction with the REVERTA-L reagent kit for cDNA synthesis from an RNA template (CRIE, Moscow), and amplification with specific primers was used to obtain sequences of viral region NS5B.

The amplification products were purified and analyzed for the fragment size and concentration. Sequencing reactions were performed according to the instructions for the ABI PRISM BigDye Terminator 3.1 reagent kit. (Applied Biosystems, USA), in triplicate, on forward and reverse primers. The ABI Prism 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA) was used to identify nucleotide sequences. The primary analysis of the obtained fragment was performed according to BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) in comparison with nucleotide sequences given in GenBank international database. The obtained sequences were aligned in MEGA v.7.0 with use of ClustalW algorithm [17].

For phylogenetic tree creation and subsequent phylogenetic analysis, distances between sequences were considered by neighbour-joining allowing

**Table 1. Distribution of HBV and HCV serological markers (HBsAg, anti-HBcore IgG, anti-HBs IgG, anti-HCV) in the examined group**

Revealed serological markers in blood serum	The surveyed group (n = 397), proportion of the total surveyed number
HBsAg+	49 (12.3%)
HBs IgG+	153 (38.53%)
HBcore IgG+	223 (56.17%)
Anti-HCV+	13 (3.27%)
Seronegative	74 (18.63%)

to optimize the tree in accordance with the balanced minimum evolution criterion; a bootstrap analysis for 1000 replicas was performed to assess the created trees reliability.

Statistical data processing was carried out using the MS Excel and Prizm 5.0 (GraphPad Software Inc.) software packages. The “exact” Clopper–Pearson interval was used to estimate statistical uncertainty. Results are represented as a median (Me) indicating 95% confidence interval (95% CI). Fisher exact test or Yates-corrected Chi-Squared test was used to evaluate statistical significance of numeric data obtained during the paired comparison depending on sample characteristics. Probability value  $p < 0.05$  was taken as a statistical significance threshold.

## Results

The age of the examined individuals ranged from 18 to 65 years. Among the conditionally healthy individuals who applied not for medical reasons, the ratio of men and women did not differ, amounting to 49.12 and 50.88% (95% CI: 45.85–55.9%), respectively. The sex and age structure of the surveyed group are shown in Fig. 1.

The analysis of the overall prevalence of serological markers showed that among the conditionally healthy individuals HBsAg and anti-HCV antibodies were detected in 12.3% (95% CI: 9.27–15.99%) and 3.27% (95% CI: 1.76–5.53%) of individuals, respec-

tively. The results of the distribution analysis for HBV and HCV markers in the examined group are shown in the Table 1.

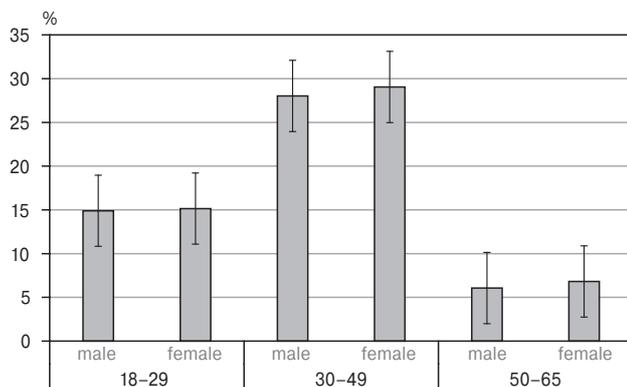
When analyzing the occurrence of markers in the group of conventionally healthy patients, depending on gender and age, it was shown that among HBsAg-positive individuals, men prevailed (75.5%) compared with women (24.5%). Thus, in the group of conventionally healthy individuals, the prevalence of HBsAg in men (19.1%) significantly exceeded that in women (5.9%),  $\chi^2 = 14.688$  with  $p = 0.0001$ ,  $df = 1$ , calculated odds ratio OR = 3.751 (95% CI: 1.892–7.439). We did not find any dependence of the anti-HCV Ig G distribution on sex and age.

In the examination of 397 clinical blood serum samples for HBV DNA and HCV RNA presence using AmpliSens® HCV/HBV/HIV-FL commercial kit, the HCV was detected in 7 samples, which accounted for 1.76% (95% CI: 0.71–3.6%), and HBV detected in 42 of HBsAg-positive patients, which accounted for 10.58% (95% CI: 7.73–14.03%).

Using a method that detects HBV DNA at low viral load, HBV was detected in all HBsAg-positive samples, as well as in 58 HBsAg-negative samples, which amounted to 14.61% (95% CI: 11.28–18.47%). Thus, among conditionally healthy patients, taking into account HBsAg-positive and negative samples, DNA HBV was detected in 26.95% (95% CI: 22.65–31.6%).

Research on HBV and HCV genovariant prevalence in different regions of the world have been actively carried out from the moment of the genotypes’ discovery until the present. All genotypes and serotypes have different geographic distribution, which is changing very slowly with time reflecting viral propagation paths related to human migration, as well as possible different geographical origins of different genotypes, which allows using them as epidemiological markers [27]. Therewith, in most regions with rare exceptions, 1–2 prevailing genotypes and several minor ones are circulating including those imported from other areas [28]. The tendency observed over the last years to prevalence displacement of one or another HBV or HCV genotype in various geographic areas due to international contact development, labor migration flows, especially from the regions with high hepatotropic virus prevalence, makes clinicians and epidemiologists pay focused attention to the hepatitis B and C epidemiological situation, not only in their region, but also in neighboring ones [6].

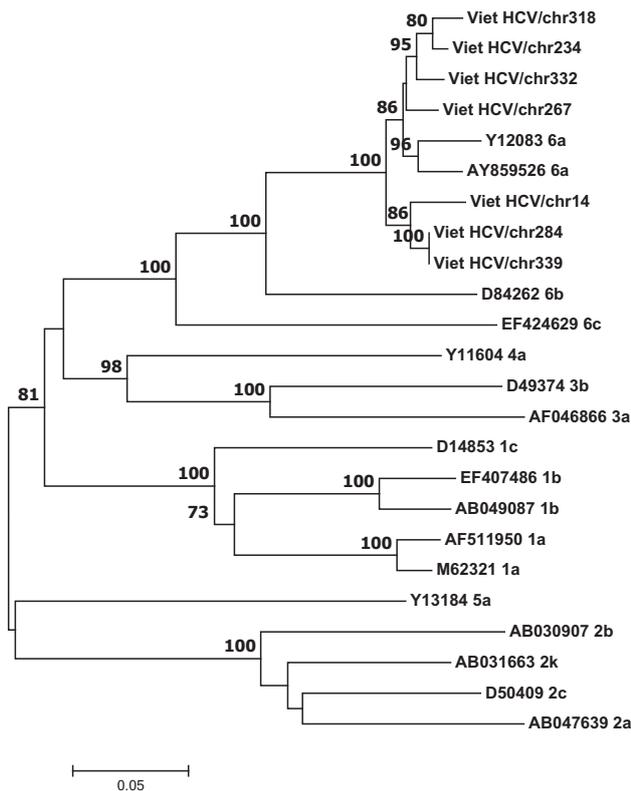
For further HCV analysis, sequencing of the NS5B viral regions of 7 samples (100%) from a group of apparently healthy patients was carried out. Phylogenetic analysis showed that all isolates of the conventionally healthy group belong to genotype 6, subtype 6a (100%). Phylogenetic relationships between the examined HCV isolates from conventionally healthy patients, and reference sequences from the GenBank international database are shown in Fig. 2.

**Figure 1. Age- and sex-related sample distribution**

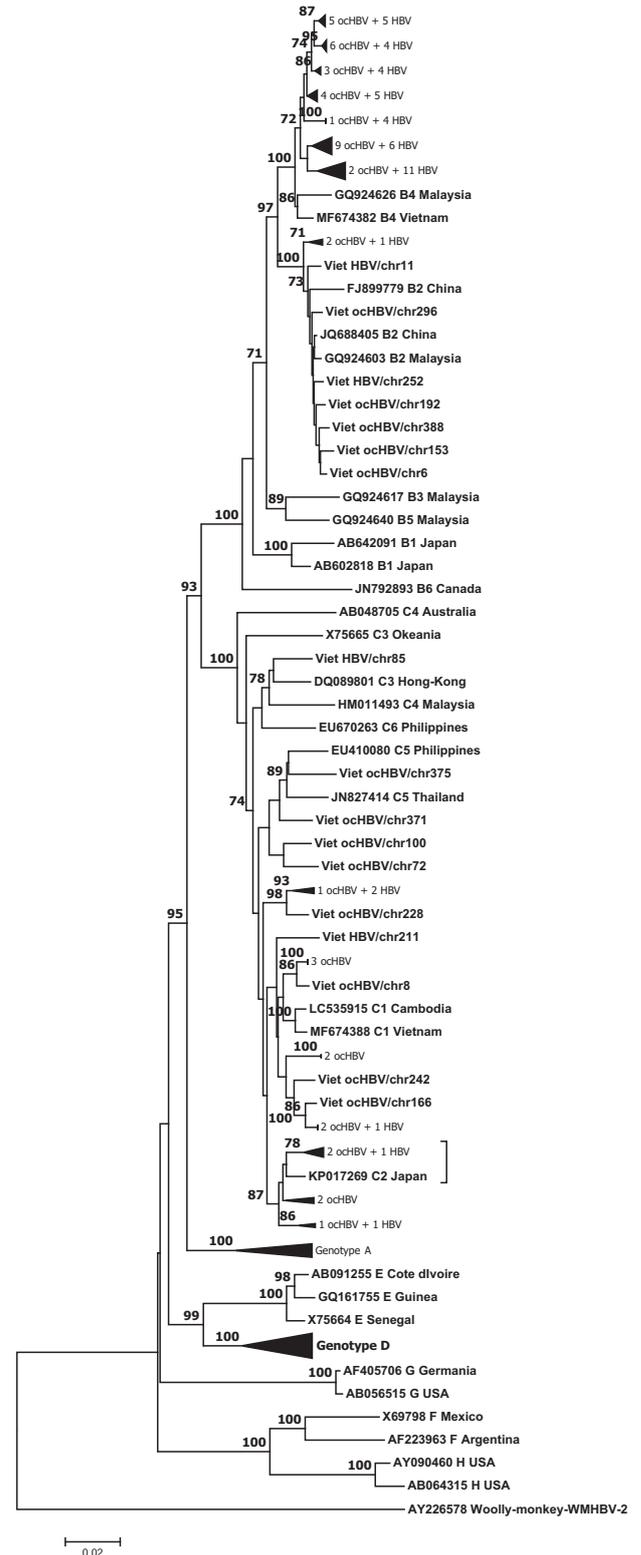
Phylogenetic analysis of HBV (n = 107) showed that the prevalence of HBV genotype B (73.84%) compared to genotype C (26.16%). With regard to the deep typing results, subtype B4 prevalence is 64.49%. Subtypes C1 (14.95%), B2 (9.35%), C2 (6.54%), C3 (0.93%), and C5 (3.74%) were also identified. Phylogenetic relationships between the examined HBV isolates from conventionally healthy patients, and reference sequences from the GenBank international database are shown in Fig. 3.

**Discussion**

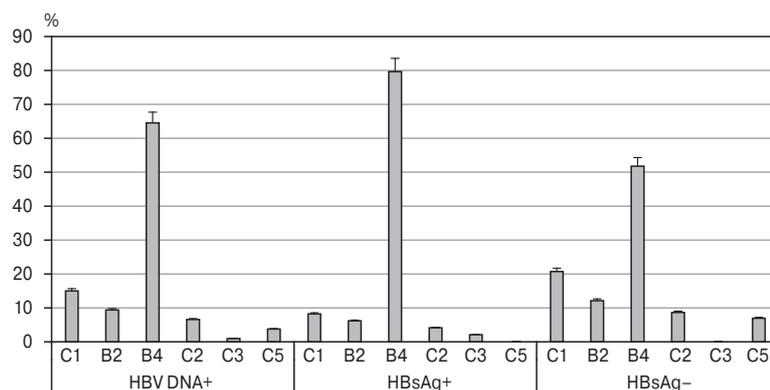
Out of 397 plasma samples, 13 (3.27%) were with anti-HCV antibodies and 7 (1.76% of the entire group) of them were confirmed RNA HCV. Our results do not contradict other relevant studies. The prevalence of anti-HCV in Vietnam is estimated to be 6.1%. However, the prevalence is not uniform throughout the country and in different groups. Hence, the anti-HCV antibody rate in blood donors is: 20.6% in Ho Chi Minh City in Southern Vietnam; 0.8% in Hanoi in Northern Vietnam; 9% in individuals without liv-



**Figure 2. Phylogenetic analysis of NS5B regions HCV nucleotide sequences isolated from apparently healthy residents of the Socialist Republic of Vietnam (Southern Vietnam) in comparison with the reference sequences retrieved from the international GenBank database**  
**Notes.** Reference sequences are designated with GenBank codes indicating the genotype/subgenotype. Bootstrap values higher than 70% based on 1000 replications are shown at branching points.



**Figure 3. Phylogenetic analysis of HBV genome nucleotide sequences isolated from apparently healthy residents of the Socialist Republic of Vietnam (Southern Vietnam) in comparison with the reference sequences retrieved from the international GenBank database**  
**Notes.** Reference sequences are designated with GenBank codes indicating the genotype/subgenotype. Woolly monkey HVB (AY226578) was used as an outgroup. Bootstrap values higher than 70% based on 1000 replications are shown at branching points.



**Figure 4. Distribution of HBV subtypes among HBsAg-positive and negative samples**

er disease in Ho Chi Minh City; and 4% in Hanoi; 22.9–89.0% in HIV-infected individuals; and 74.0–87.0% in IDU [18].

We did not reveal any dependence of the anti-HCV IgG distribution on sex or age, although there is data in the literature on an increase in the prevalence of HCV antibodies in people over 50 in the south of Vietnam [9].

Our findings showed that only subtype HCV 6a is presented in Southern Vietnamese conditionally healthy residents, and we did not find any genotype 1. Our results contradict studies according to which genotypes 1 and 6 are widespread in the southern region of Vietnam, but the prevalence of one or the other genotype differs in different sources. For example, some report a predominance of genotype 6 among blood donors and in the general population [8]; others report a predominance of genotype 1, in particular 1b (58%), followed by genotype 6a (17%), among patients with liver disease [19]. The genotype prevalence among conditionally healthy persons has never been clearly determined. Although Vietnam is among those countries in which genotype 6 variants were first detected, it cannot be argued that only genotype 6a is common among conventionally healthy individuals. We assume that the identification only one of subtype in the surveyed group is associated with limited sample size. An indirect confirmation of this is the work of Le Ngoc C. et al. In their study, genotype 6 prevailed in patients with chronic HCV mono-infection (44.4%) compared with patients with HIV + HCV coinfection [18]. It was also shown that more than half of the Vietnamese patients who lived in Ho Chi Minh City were infected with genotype 6 variants, and the reason why these HCV variants are cir-

culating in this limited geographical region remains unknown [24]. Regarding other countries, subtype 6a circulate in South-East Asia including Thailand, Myanmar, Laos PDR and in the South-China territories of Hong-Kong and Macau, as well as in China's southernmost provinces of Yunnan and Guangxi [23].

The prevalence values of HBsAg, anti-HBs IgG, and anti-HBcore IgG in the study groups were 12.34, 38.53, and 56.17%, respectively. Thus, over 78% (95% CI: 73.69–82.06%) have been exposed to the virus, which is confirmed by anti-HBcore IgG and anti-HBs IgG antibody detection. A similar picture of HBV serological marker occurrence in the population is presented in the works of other researchers. For example, among of 509 adults, comprised of 230 men (45.2%) and 279 women (54.8%), prevalence of HBsAg, anti-HBs IgG and anti-HBcore IgG were 15.3, 60.3 and 71.7%, respectively [9]. In another study, when analyzing serological markers in 837 samples from patients aged 16–82 years, prevalence of anti-HBcore and HBsAg were 68.2% and 19.0%, respectively [21]. In our study, the prevalence of HBsAg was higher in males than females.

The PCR technique is widely used for molecular diagnostics of HBV. Testing performed with the AmpliSens® HBV-FL commercial kit showed that the HBV DNA prevalence in the group (10.57%) is comparable with the HBsAg detection frequency (12.34%). Nevertheless, both techniques are not sufficiently sensitive, and it is proved by the detection of HBV DNA in another 58 seronegative patients (14.61% of total samples) when we used the technique developed at the Saint Petersburg Pasteur Institute for detection of HBV DNA at low viral loads (Table 2). Thus, the prevalence of HBV DNA in the

**Table 2. Results of HBV DNA low concentration detection in blood serum samples**

HBV DNA	Samples number n = 397 (100%)	HBsAg in blood serum samples	
		HBsAg (+) n = 49 [12.34% from n = 397 (CI 95%: 9.27–15.99%)]	HBsAg (-) n = 348 [87.66% from n = 397 (CI 95%: 84.01–90.73%)]
HBV DNA+	107 (26.95%) (CI 95%: 22.65–31.5%)	49 (45.79%) (CI 95%: 36.12–55.7%)	58 (54.21%) (CI95%: 44.3–63.88%)

examined group (26.95%) exceeds the previously published prevalence rates for the virus in the region. It can be assumed that this is due to the limitation of the methods used, which do not allow detecting the HBsAg-negative form of the course of CHB at a low viral load.

Confidence intervals overlapping in HBV DNA detection in HBV-positive patients indicates two independent phases of CHB natural progression — accompanied and non-accompanied by virus replication with active sub-genome RNA translation with HBV cccDNA persistence in hepatic cell cores, but with entire-genome RNA transcription suppression, which, however, does not evidence virus elimination.

It is known that chronic infection is characterized by persistent HBsAg presence over at least 6 months (with concomitant HBeAg presence or absence), and its level in blood serum constitutes the main marker for disease development risk assessment and CHB forecasting, as well as for HBV diagnostics in general. However, one of CHB's natural progression forms is presented by occult hepatitis B infection (OBI), which is characterized by HBV DNA persistence in liver tissue and extremely low HBV DNA concentration with undetectable HBsAg level in peripheral blood [12]. OBI development is conditioned by suppression of sub-genomic HBV RNA endonuclear transcription from the covalently closed circular HBV DNA matrix, based on which viral genome and viral proteins are synthesized [28]. The suppression may be caused by a number of factors which are not yet fully understood, including genetic traits of the virus itself and/or of its host, or by external interference. Hence, in most cases, viral replication and gene expression may be suppressed to such an extent that viral load in a patient's peripheral blood is extremely low, down to the impossibility of HBV DNA detection by standard methods, yet virus elimination does not happen under the replication suppression [26]. Despite the HBsAg absence in peripheral blood, most patients with OBI are seropositive for one or several serological markers depending on disease progression phase: anti-HBs IgG; HBeAg; anti-HBe IgG; anti-HBcore IgG. However, over 20% of patients are seronegative for all HBV markers [26].

Despite the considerable public healthcare problems associated with HBV in Vietnam, it should be noted that HBV detection methods and HBV-related liver disease diagnostics in low or medium income countries significantly differ from those used in countries which have access to more advanced technologies. Most studies on this subject in Vietnam are limited to measurement of HBV surface antigen; molecular genetic methods permitting more accurate assessment of HBV prevalence and genotyping the virus are available only in large cities' central laboratories [2]. Further, there are limited data on HBV marker prevalence in the population since screening is performed predominantly in separate population

groups: high-risk groups (HIV-infected persons, IDU, etc.); and in the groups, where infection prevalence significantly influences public health (blood donors, pregnant women). Occult hepatitis B infection occurrence varies around the world. However, it generally correlates with the manifest HBV form's occurrence [13]. In our study, the high OBI occurrence should be noted, which is peculiar to the regions where HBV is widely occurring. It should be noted that HBV has the highest prevalence among low-income population groups, including the rural population, while our study included mainly persons with relatively favorable social and economic position by this region's standards. We suppose that examination in poorer populations of this geographic region would indicate considerably higher rates of HBV molecular marker prevalence.

Our results of HBV genotyping indicate that HBV genotype B dominates in Southern Vietnam, followed by genotype C. This is consistent with earlier data published in Vietnam. However, while it is known that OBI genotypes and sub-types correlate with HBV genotype distribution in a particular region [13], literature data on occult HBV epidemiologic situations in Vietnam are very few. With regard to the above, we deemed it necessary to analyze HBV genotype distribution within the obtained sample collection in two groups: in the HBsAg-positive ( $n = 49$ ); and HBsAg-negative ( $n = 58$ ). When comparing the distribution of genotypes in both groups, they do not differ from the distribution in the total group, but have significant differences from each other ( $\chi^2 = 12.39$ ,  $p = 0.0298$ ,  $df = 5$ ). The identified HBV genotypes and sub-types are, in general, peculiar to Vietnam. However, the shown proportion considerably differs from total data. For example, among patients with chronic hepatitis undergoing treatment, genotype B (71.43%) prevailed compared to C (27.55%); one isolate was recombinant (between B and C). Among the isolates of genotype B, 92.86% were subgenotype B4, with 7.14% — B2. The others: 92.6% of subgenotype C belongs to C1; 3.7% — subgenotype C2; and the remaining 3.7% — C3 [32]. Our results of HBV genotyping indicate that HBV genotype B occurrence frequency among HBsAg-positive individuals (85.72%) is much closer to the data of other researchers (71.43% among patients with CHB or 75.3% among randomly sampled individuals) [9, 32], than the corresponding frequency among OBI patients (63.79%). Interestingly, a lower representation of genotype B (67.8%) and high genotype C (27.9%), which is similar to our results for OBI patients, was shown among CHB patients in Northern Vietnam [33]. Our study identified that subtype B4 occurrence frequency was significantly lower (51.72%), and that of subtypes C1 (20.69%) and B2 (12.07%) among OBI was higher than the occurrence of those among HBsAg-positive individuals: 79.6, 8.16, and 6.12%, respectively. The distribution of HBV genotypes/subtypes in groups is shown in Fig. 4.

While it was shown that in Vietnam, genotype C has a higher load than genotype B and is associated with more severe liver diseases [33], while among the HBsAg-negative samples we examined, genotype C isolates are presented with a significantly lower viral load. It can be assumed that the diagnostic methods commonly used in the region do not allow identifying these cases. Due to this, in the cases described in the literature, the prevalence of HBV genotype C is somewhat lower than was found in our study. In addition, in our study, a significant number of C5 subtype samples (3.74%) were identified among HBsAg-negative samples. Previously, cases of HBV C5 detection were reported, but in single quantities, when reported that HBV subtype B4 (82.6%) predominated in at-risk groups, and other genotypes detected included B2 (2.7%), C1 (14.6%) and C5 (0.5%) [10].

Nevertheless, when evaluating the HBV diversity pattern in the entire examined group material, a close genetic relationship of manifest CHB and OBI isolates became apparent, which also indicates OBI prevalence in the region. It should be noted that all HBV subtypes presented in the surveyed group are also common in neighboring countries. However, in Cambodia, genotype C (80.49%) was abundantly found throughout the whole of Cambodia, while genotype B (19.51%) was exclusively found in regions bordering Vietnam [14]. In Thailand, the majority of OBI samples were HBV genotype C (81.3%), with 6.3% of samples being genotype B, although genotype I was also detected [8]. In Laos, multiple genotypes and subtypes cocirculate and many recombinant viral forms are present, including subtypes B1,

B2, B4, C1, C5, I1, and I2 [5]. On the other hand, the demonstrated HBV subtype distribution and similarity between some of them and isolates from other Asian countries are evidence of high irregularity of their prevalence in Vietnam.

Despite their rarity, cases of mixed infection and recombination have been reported in Vietnam. In our study, we could neither detect viral genome recombination nor cases of coinfection with different HBV genotypes. Our limited number of samples might account for the apparent absence of either recombination or coinfection.

It should be noted that the results obtained here for conventionally healthy patients cannot be considered representative population data since we estimated the prevalence of viral hepatitis markers in the population visiting hospitals; some socioeconomic or occupational groups may have more reasons to visit hospitals than others. Thus, these samples may represent individuals with a higher risk of infection in general, and therefore may not be representative of the population.

## Conclusion

Our work has shown a high prevalence of parenteral viral hepatitis markers among conditionally healthy residents of southern Vietnam. Particular attention should be paid to the high prevalence of HBsAg-negative HBV in the region, which indicates the insufficiency of the currently used methods both for detection of the virus and for infection prevention (prophylaxis).

## References

1. Мукомолов С.Л., Левакова И.А. Эпидемиологическая характеристика хронических вирусных гепатитов в Российской Федерации в 1999–2009 гг. // *Инфекция и иммунитет*. 2011. Т. 1, № 3. С. 255–262. [Mukomolov S.L., Levakova I.A. Epidemiological characteristics of chronic viral hepatitis in the Russian Federation in 1999–2009. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2011, vol. 1, no. 3, pp. 255–262. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2011-3-255-262
2. Останкова Ю.В., Найденова Е.В., Серикова Е.Н., Шемелев А.Н., Валутите Д.Э., Зуева Е.Б., Хуйнх Х.К.Т., Семенов А.В. К вопросу о коинфицировании вирусами Денге и возбудителями гемоконтактных инфекций в Социалистической Республике Вьетнам // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021. № 3. С. 6–12. [Ostankova Yu.V., Naidenova E.V., Serikova E.N., Shchemelev A.N., Valutite D.E., Zueva E.B., Huynh H.K.T., Semenov A.V. On the question of with Dengue virus- and pathogens of hemocontact infections coinfection in the Socialist Republic of Vietnam. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2021, no. 3, pp. 6–12. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2021-3-6-12
3. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Тотолан Арег А. Выявление вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019. Т. 64, № 10. С. 635–640. [Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Totolian Areg A. Hepatitis B virus identification in a blood plasma at a low viral load. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2019, vol. 64, no. 10, pp. 635–640. (In Russ.)] doi: 10.18821/0869-2084-2019-64-10-635-640
4. Серикова Е.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Тотолан Арег А. Метод выявления вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке с использованием ПЦР в режиме реального времени // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021. Т. 66, № 1. С. 59–64. [Serikova E.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Totolian Areg A. Hepatitis B virus identification in a blood plasma at a low viral load by PCR Real Time. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2021, vol. 66, no. 1, pp. 59–64. (In Russ.)] doi: 10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64
5. Andernach I.E., Jutavijittum P., Samountray B., Yousukh A., Thammavong T., Hübschen J.M., Müller C.P. A high variability of mixed infections and recent recombinations of hepatitis B virus in Laos. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 2: e30245. doi: 10.1371/journal.pone.0030245
6. Bissinger A.L., Fehrle C., Werner C.R., Lauer U.M., Malek N.P., Berg C.P. Epidemiology and genotyping of patients with chronic hepatitis B: genotype shifting observed in patients from Central Europe. *Pol. J. Microbiol.*, 2015, vol. 64, no. 1, pp. 15–21.
7. Cavalcante L.N., Lyra A.C. Predictive factors associated with hepatitis C antiviral therapy response. *World J. Hepatol.*, 2015, vol. 7, no. 12, pp. 1617–1631. doi: 10.4254/wjh.v7.i12.1617

8. Chamni N., Louisirirochanakul S., Oota S., Sakuldamrongpanish T., Saldanha J., Chongkolwatana V., Phikulsd S. Genetic characterization and genotyping of hepatitis B virus (HBV) isolates from donors with an occult HBV infection. *Vox Sang*, 2014, vol. 107, no. 4, pp. 324–32. doi: 10.1111/vox.12178
9. Do S.H., Yamada H., Fujimoto M., Ohisa M., Matsuo J., Akita T., Katayama K., Van Nguyen N., Miyakawa Y., Tanaka J. High prevalences of hepatitis B and C virus infections among adults living in Binh Thuan province, Vietnam. *Hepatol. Res.*, 2015, vol. 45, no. 3, pp. 259–268. doi: 10.1111/hepr.12350
10. Dunford L., Carr M.J., Dean J., Nguyen L.T., Ta Thi T.H., Nguyen B.T., Connell J., Coughlan S., Nguyen H.T., Hall W.W., Thi L.A. A multicentre molecular analysis of hepatitis B and blood-borne virus coinfections in Viet Nam. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 6: e39027. doi: 10.1371/journal.pone.0039027
11. Gish R.G., Bui T.D., Nguyen C.T., Nguyen D.T., Tran H.V., Trinh H.N.; International Group for Liver Health in Viet Nam. Liver disease in Viet Nam: screening, surveillance, management and education: a 5-year plan and call to action. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2012, vol. 27, no. 2, pp. 238–247. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06974.x
12. Guo J.T., Guo H. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: Implications for the development of cccDNA-targeting antiviral therapeutics. *Antiviral Res.*, 2015, vol. 122, pp. 91–100. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.08.005
13. Kishk R., Atta H.A., Ragheb M., Kamel M., Metwally L., Nembr N. Genotype characterization of occult hepatitis B virus strains among Egyptian chronic hepatitis C patients. *East Mediterr. Health J.*, 2014, vol. 20, no. 2, pp. 130–138.
14. Ko K., Takahashi K., Nagashima S., Yamamoto C., Ork V., Sugiyama A., Akita T., Ohisa M., Chuon C., Hossain M.S., Mao B., Tanaka J. Existence of hepatitis B virus surface protein mutations and other variants: demand for hepatitis B infection control in Cambodia. *BMC Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 1: 305. doi: 10.1186/s12879-020-05025-3
15. Korean Association for the Study of the Liver. KASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B. *Clin. Mol. Hepatol.*, 2016, vol. 22, no. 1, pp. 18–75. doi: 10.3350/cmh.2016.22.1.18
16. Korean Association for the Study of the Liver. KASL clinical practice guidelines: management of hepatitis C. *Clin Mol Hepatol.*, 2016, vol. 22, no. 1, pp. 76–139. doi: 10.3350/cmh.2016.22.1.76
17. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 2016, vol. 33, no. 7, pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
18. Le Ngoc C., Tran Thi Thanh T., Tran Thi Lan P., Nguyen Mai T., Nguyen Hoa T., Nghiem My N., Le Van T., Le Manh H., Le Thanh P., Nguyen Van Vinh C., Thwaites G., Cooke G., Heilek G.M., Shikuma C., Le T., Baker S., Rahman M.; VIZIONS Consortium. Differential prevalence and geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in acute and chronic hepatitis C patients in Vietnam. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 3: e0212734. doi: 10.1371/journal.pone.0212734
19. Li C., Yuan M., Lu L., Lu T., Xia W., Pham V.H., Vo A.X.D., Nguyen M.H., Abe K. The genetic diversity and evolutionary history of hepatitis C virus in Vietnam. *Virology*, 2014, vol. 468–470, pp. 197–206. doi: 10.1016/j.virol.2014.07.026
20. Nguyen V.T., Law M.G., Dore G.J. An enormous hepatitis B virus-related liver disease burden projected in Vietnam by 2025. *Liver Int.*, 2008, vol. 28, no. 4, pp. 525–531. doi: 10.1111/j.1478-3231.2007.01646.x
21. Nguyen V.T., McLaws M.L., Dore G.J. Highly endemic hepatitis B infection in rural Vietnam. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2007, vol. 22, no. 12, pp. 2093–2100. doi: 10.1111/j.1440-1746.2007.05010.x
22. Norder H., Couroucé A.-M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S.-D., Mushahwar I.K., Robertson B.H., Locarnini S., Magnius L.O. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*, 2004, vol. 47, no. 6, pp. 289–309. doi: 10.1159/000080872
23. Pham D.A., Leuangwutiwong P., Jittmittraphap A., Luplertlop N., Bach H.K., Akkarathamrongsin S., Theamboonlers A., Poovorawan Y. High prevalence of Hepatitis C virus genotype 6 in Vietnam. *Asian Pac J. Allergy Immunol.*, 2009, vol. 27, no. 2–3, pp. 153–160.
24. Pham V.H., Nguyen H.D., Ho P.T., Banh D.V., Pham H.L., Pham P.H., Lu L., Abe K. Very high prevalence of hepatitis C virus genotype 6 variants in southern Vietnam: large-scale survey based on sequence determination. *Jpn J. Infect Dis.*, 2011, vol. 64, no. 6, pp. 537–539.
25. Pourkarim M.R., Amini-Bavil-Olyae S., Kurbanov F., Van Ranst M., Tacke F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 20, no. 23, pp. 7152–7168. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7152
26. Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F., Lok A.S.; Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.*, 2019, vol. 71, no. 2, pp. 397–408. doi: 10.1016/j.jhep.2019.03.034
27. Schweitzer A., Horn J., Mikolajczyk R.T., Krause G., Ott J.J. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet*, 2017, vol. 386, no. 10003, pp. 1546–1555. doi: 10.1016/S0140-6736(15)61412-X
28. 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
29. Stasi C., Silvestri C., Voller F. Emerging trends in epidemiology of hepatitis B virus infection. *J. Clin. Transl. Hepatol.*, 2017, vol. 5, no. 3, pp. 272–276. doi: 10.14218/JCTH.2017.00010
30. Tanwar S., Dusheiko G. Is there any value to hepatitis B virus genotype analysis? *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 2012, vol. 14, no. 1, pp. 37–46. doi: 10.1007/s11894-011-0233-5
31. Te H.S., Jensen D.M. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis.*, 2010, vol. 14, no. 1, pp. 1–21. doi: 10.1016/j.cld.2009.11.009
32. Trang N.H., That B.T.T., Thanh T.T.T., Chau L.N., Thanh T.T., Ngoc N.M., Hung N.M., Chau N.V.V., Rahman M. A17 Molecular characteristics of hepatitis B virus (HBV) isolated from chronic hepatitis B patients in South Vietnam. *Virus Evol.*, 2017, vol. 3, no. 1: vew036.016. doi: 10.1093/ve/vew036.016

33. Truong B.X., Seo Y., Yano Y., Ho P.T., Phuong T.M., Long D.V., Son N.T., Long N.C., Kato H., Hayashi Y., Trach N.K., Kasuga M. Genotype and variations in core promoter and pre-core regions are related to progression of disease in HBV-infected patients from Northern Vietnam. *Int J. Mol. Med.*, 2007, vol. 19, no. 2, pp. 293–299. doi: 10.3892/ijmm.19.2.293
34. WHO. Prevention and control of viral hepatitis infection: frame work for global action 2012. *Geneva: WHO*, 2012. 24 p.
35. WHO. Sixty-ninth world health assembly provisional agenda item 15.1. Draft global health sector strategies. Viral hepatitis, 2016–2021. *Geneva: WHO*, 2016. 44 p.
36. Yano Y., Azuma T., Hayashi Y. Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics. *World J. Hepatol.*, 2015, vol. 7, no. 3, pp. 583–592. doi: 10.4254/wjh.v7.i3.583
37. Yim H.J., Lok A.S. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*, 2006, vol. 43, no. S1, pp. S173–S181. doi: 10.1002/hep.20956

**Авторы:**

**Останкова Ю.В.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Семенов А.В.**, д.б.н., директор Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

**Зуева Е.Б.**, к.б.н., биолог отделения диагностики ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Серикова Е.Н.**, научный сотрудник лаборатории вирусологии и иммунологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Щемелев А.Н.**, младший научный сотрудник лаборатории вирусологии и иммунологии ВИЧ-инфекции, аспирант ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Валутите Д.Э.**, врач клинико-лабораторной диагностики отделения диагностики ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Хуйнх Х.К.Т.**, научный сотрудник лаборатории медицинских анализов Института имени Пастера в г. Хошимин, г. Хошимин, Вьетнам;

**Егорова С.А.**, д.м.н., зам. директора по инновациям ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Тотолан Арег А.**, академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Ostankova Yu.V.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Semenov A.V.**, PhD, MD (Biology), Director of Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections of SRC VB Vector of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Ekaterinburg, Russian Federation;

**Zueva E.B.**, PhD (Biology), Biologist, Department of Diagnostics of HIV Infection and AIDS-associated Diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Serikova E.N.**, Researcher, Laboratory of Virology and Immunology of HIV Infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Schemelev A.N.**, Junior Researcher, Laboratory of Virology and Immunology of HIV Infection, Postgraduate Student, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Valutite D.E.**, Clinical Laboratory Diagnostics Doctor, Department of Diagnostics of HIV Infection and AIDS-associated Diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Huynh H.K.T.**, Researcher, Medical Analysis Laboratory Department, Ho Chi Minh Pasteur Institute, Ho Chi Minh City, Vietnam;

**Egorova S.A.**, PhD, MD (Medicine), Deputy Director for Innovation, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Totolian Areg A.**, RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

# ЗАВИСИМОСТЬ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО СОСТАВА Т-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С ОТ ГЕНОТИПА ВИРУСА (ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ПРЕПАРАТАМИ ПРЯМОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ)

А.А. Савченко<sup>1</sup>, В.В. Цуканов<sup>1</sup>, И.В. Кудрявцев<sup>2,3</sup>, Ю.Л. Тонких<sup>1</sup>, В.Д. Беленюк<sup>1</sup>, М.А. Черепнин<sup>1</sup>, А.А. Анисимова<sup>1</sup>, А.Г. Борисов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Целью исследования было изучение фенотипа эффекторных Т-лимфоцитов у больных хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) до и после лечения препаратами прямого противовирусного действия в зависимости от генотипа вируса. Обследовано 50 больных ХВГС без признаков цирроза печени. Диагноз устанавливали на основании эпидемиологических и клинико-лабораторных данных при обнаружении специфических серологических маркеров ХВГС и РНК вируса гепатита С (ВГС) в соответствии с рекомендациями Европейской ассоциации по изучению печени (EASL, 2016). Содержание РНК ВГС определяли методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Степень фиброза печени у больных ХВГС оценивали с помощью ультразвуковой эластографии. Лечение больных осуществляли в течение 3 месяцев препаратами прямого противовирусного действия согласно рекомендациям EASL 2016 г. В контрольную группу вошли 46 практически здоровых лиц, у которых во время профилактического осмотра были исключены выраженные хронические заболевания различных органов и систем, отсутствовали жалобы на состояние здоровья и определялись соответствовавшие норме показатели клинического и биохимического анализов крови при отсутствии маркеров к вирусным гепатитам В и С, антител к описторхисам; факт злоупотребления алкоголем в анамнезе отрицался. Исследование субпопуляционного состава хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов осуществляли методом прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови. Нами получен 100% устойчивый вирусологический ответ у больных с 1, 2 и 3 генотипами ХВГС без признаков цирроза печени при применении терапии Софосбувиром (400 мг) и Даклатасвиром (60 мг) в течение 12 недель. Установлено, что у больных ХВГС в зависимости от генотипа ВГС были обнаружены характерные особенности в фенотипическом составе эффекторных Т-лимфоцитов до и после лечения препаратами прямого противовирусного действия. При генотипах 1 и 3 ВГС у больных повышалось содержание терминально-дифференцированных эффекторных (TEMRA) Т-хелперов и эффекторной памяти (EM). Только у пациентов с генотипом 2 ВГС в крови понижался уровень

## Адрес для переписки:

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

## Contacts:

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

## Для цитирования:

Савченко А.А., Цуканов В.В., Кудрявцев И.В., Тонких Ю.Л., Беленюк В.Д., Черепнин М.А., Анисимова А.А., Борисов А.Г. Зависимость фенотипического состава Т-лимфоцитов у больных хроническим вирусным гепатитом С от генотипа вируса (до и после лечения препаратами прямого противовирусного действия) // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1141–1151. doi: 10.15789/2220-7619-ARB-1550

## Citation:

Savchenko A.A., Tsukanov V.V., Kudryavtsev I.V., Tonkih J.L., Belenjuk V.D., Cherepnin M.A., Anisimova A.A., Borisov A.G. A relation between T cell phenotypic profile and virus genotype in patients with chronic viral hepatitis (before and after treatment with direct antiviral agents) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1141–1151. doi: 10.15789/2220-7619-ARB-1550

Т-хелперов ЕМ. Независимо от генотипа ВГС снижалось относительное количество Т-хелперов центральной памяти (СМ). Уровень эффекторных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов у больных ХВГС соответствовал контрольным уровням или превышал их в зависимости от генотипа ВГС. У больных с генотипом 1 ВГС уровень всех исследуемых субпопуляций эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов был равен контрольным значениям. У пациентов с генотипом 2 ВГС в периферической крови повышалось количество наивных цитотоксических Т-клеток и СМ. У больных с генотипом 3 ВГС в крови было увеличено содержание наивных цитотоксических Т-лимфоцитов, СМ и ТЕМРА. Наибольшая вирусная нагрузка была выявлена у больных ХВГС с генотипом 1 ВГС. Фиброз печени был наиболее выражен у больных ХВГС с генотипами 2 и 3 ВГС. Через 3 месяца лечения препаратами прямого противовирусного действия у больных ХВГС независимо от генотипа ВГС сохранялось сниженное содержание Т-хелперов СМ. Дополнительно к этому у пациентов с генотипами 1 и 3 ВГС выявлялось понижение количества наивных Т-хелперов, а у больных с генотипами 2 и 3 ВГС нормализовывалось содержание наивных цитотоксических Т-лимфоцитов.

**Ключевые слова:** хронический вирусный гепатит С, вирус гепатита С, генотип, Т-лимфоциты, фенотип, лечение.

## A RELATION BETWEEN T CELL PHENOTYPIC PROFILE AND VIRUS GENOTYPE IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS (BEFORE AND AFTER TREATMENT WITH DIRECT ANTIVIRAL AGENTS)

Savchenko A.A.<sup>a</sup>, Tsukanov V.V.<sup>a</sup>, Kudryavtsev I.V.<sup>b,c</sup>, Tonkih J.L.<sup>a</sup>, Belenjuk V.D.<sup>a</sup>, Cherepnin M.A.<sup>a</sup>, Anisimova A.A.<sup>a</sup>, Borisov A.G.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the study was to investigate the phenotype of effector T lymphocytes in patients with chronic viral hepatitis C (CVHC) before and after of treatment with direct antiviral drugs depending on the genotype of the virus. 50 patients with CVHC without signs of liver cirrhosis were examined. The diagnosis was made on the basis of epidemiological and clinical laboratory data as recommended by the European Association for the Study of the Liver when specific serological markers of CHCV and RNA of hepatitis C virus (HCV) were detected (EASL, 2016). The determination of HCV RNA was carried out by the method of quantitative polymerase chain reaction in real time. The degree of liver fibrosis in patients with CVHC was assessed using ultrasound elastography. Patients were treated for 3 months with direct antiviral drugs according to the recommendations of the European Association for the Study of the Liver (2016). The control group included 46 practically healthy individuals with severe chronic diseases of various organs and systems excluded during a routine examination, no health complaints, having normal clinical and biochemical blood tests in the absence of markers for viral hepatitis B and C, antibodies to opisthorchis and denying history of alcohol abuse. The study of the subpopulation composition of helper and cytotoxic T lymphocytes was carried out by direct immunofluorescence of whole peripheral blood. We obtained a 100% sustained virological response in patients with 1, 2 and genotypes of CHCV without signs of liver cirrhosis when using therapy with Sofosbuvir (400 mg) and Daclatasvir (60 mg) for 12 weeks. It was found that in CVHC patients were found characteristic features in the phenotypic composition of effector T lymphocytes before and after treatment with direct antiviral drugs in depending on the genotype of HCV. Patients with HCV genotypes 1 and 3 had an increase in the content of terminal differentiated effector (TEMRA) T helpers and effector memory (EM). Only patients with HCV genotype 2 had a decrease in the level of EM T-helper cells in the blood. A decrease in the relative number of T helpers of central memory (CM) was independent of the HCV genotype. The level of effector subpopulations of cytotoxic T lymphocytes in patients with CVHC was consistent with or exceeded control levels in depending on the genotype of HCV. The level of all investigated subpopulations of effector cytotoxic T lymphocytes in patients with HCV genotype 1 was equal to the control values. The number of naïve cytotoxic T cells and CM in peripheral blood in patients with HCV genotype 2 was increased. The content of naïve cytotoxic T lymphocytes, CM and TEMRA in patients with genotype 3 HCV in the blood was increased. The highest viral load was detected in patients with CVHC with genotype 1 HCV. Liver fibrosis was most pronounced in patients with CVHC infection with HCV genotypes 2 and 3. After 3 months of treatment with direct antiviral drugs the patients with CVHC had a reduced content of CM T helpers regardless of the HCV genotype. In addition, patients with HCV genotypes 1 and 3 had a decrease in the number of naïve T helpers and patients with HCV genotypes 2 and 3 had a normalization of the content of naïve cytotoxic T lymphocytes.

**Key words:** chronic viral hepatitis C, hepatitis C virus, genotype, T lymphocytes, phenotype, treatment.

## Введение

Одной из основных причин хронических заболеваний печени является инфекция, вызванная вирусом гепатита С (ВГС). К настоящему времени число инфицированных ВГС людей

в мире составляет более 185 млн человек [8, 25, 26]. Хроническая инфекция ВГС часто сопровождается развитием цирроза печени, гепатоцеллюлярного рака, печеночной недостаточности и, как следствие, тесно связана с неблагоприятным исходом заболевания [12, 28,

33]. Качество оказания медицинской помощи больным хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) значительно улучшилось благодаря современным методам диагностики, лечения и профилактики. Поставлена задача по устранению ВГС с помощью целенаправленных терапевтических стратегий в течении 15–20 лет, хотя прогнозируется, что вторичная смертность, связанная с ВГС-инфекцией, еще будет расти в течение следующих 20 лет [2, 9, 26]. В связи с этим появляется необходимость изучения механизмов развития инфекции ВГС для разработки стратегии предотвращения как самого заболевания, так и его осложнений

Известно, что развитие и исход инфекционно-го процесса, вызванного ВГС, зависит от состояния иммунной системы [1, 3, 28, 31]. Вероятно, именно иммунитет конкретного человека определяет исход хронической инфекции — от минимальных гистологических изменений до обширного фиброза и цирроза, с гепатоцеллюлярной карциномой или без нее. Ранее были показаны особенности иммунных изменений при вирусных гепатитах и других вирусных инфекциях с выделением типов иммунного реагирования, которые реализуются в широком диапазоне — от отсутствия какой-либо реакции до выраженных изменений в иммунной системе, связанных с развитием иммунодефицитных состояний или гиперреактивных [1].

Ключевую роль в механизмах противовирусного иммунитета (в том числе, и при ВГС) играют Т-лимфоциты. В исследовании Luxenburger Н. и соавт. (2018) показано, что особенности развития Т-клеточного ответа у больных ХВГС тесно связаны с клиническим течением инфекционного процесса [23]. Причем отрицательный вирусный клиренс определялся выраженным ответом со стороны Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. Обнаружено, что у больных ХВГС под действием инфекционного процесса развивается ремоделирование фенотипического состава Т-лимфоцитов, которое, прежде всего, реализуется в снижении количества наивных Т-клеток [34]. При этом предполагается, что относительное «старение» Т-лимфоцитов при ХВГС определяется как формированием специфических эффекторных клеток, так и повышенной чувствительностью наивных Т-клеток к апоптозу за счет повышенной экспрессии рецептора PD1 [30, 34].

В ряде исследований отмечается, что терапия ВГС препаратами прямого противовирусного действия практически всегда приводит к полной элиминации вируса и выздоровлению пациентов [2, 12]. Причем эффективность лечения повышается при определении генотипа ВГС [16, 17]. Однако влияние самой терапии на иммунные реакции, в том числе с учетом генотипа ВГС, остается неисследованным. После проведенной терапии интенсивность воспалительного про-

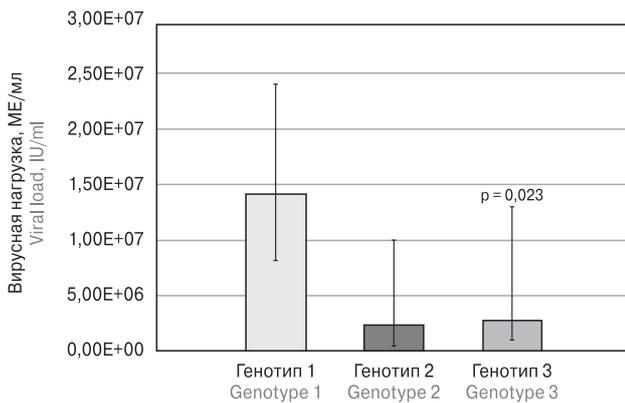
цесса и фиброза печени снижается, но не устраняется, остаются нарушения со стороны специфического Т-клеточного ответа [13, 22]. Все это определяет тот факт, что лечение ВГС не приводит к формированию эффективного защитного иммунитета, следствием чего могут быть повторные инфекции. В связи с этим появляется необходимость изучения показателей Т-клеточного иммунитета у больных ХВГС до и после лечения.

Таким образом, целью исследования было изучение фенотипа эффекторных Т-лимфоцитов у больных ХВГС до и после лечения препаратами прямого противовирусного действия в зависимости от генотипа вируса.

## Материалы и методы

Под наблюдением в клиническом гастроэнтерологическом отделении НИИ медицинских проблем Севера (г. Красноярск) находились 50 больных ХВГС в возрасте  $43,4 \pm 8,6$  лет (28 мужчин и 22 женщины). Диагноз устанавливали на основании эпидемиологических и клинико-лабораторных данных при обнаружении специфических серологических маркеров ХВГС и РНК ВГС по рекомендациям Европейской ассоциации по изучению печени (EASL) [18, 19]. Фиброз печени изучался методом сдвиговой волны транзитной эластометрии с применением ультразвуковых систем Aixplorer (Франция) или Siemens Acuson S2000 (Германия). Оценка фиброза проводилась по шкале METAVIR. Выделялось 4 степени фиброза в зависимости от выявляемых показателей эластичности печени: F0 — фиброз отсутствует ( $\leq 5,8$  кПа); F1 — портальный и перипортальный фиброз без септ ( $5,9–7,2$  кПа); F2 — портальный и перипортальный фиброз с единичными септами ( $7,3–9,5$  кПа); F3 — портальный и перипортальный фиброз со множественными мостовидными порто-портальными и порто-центральными септами ( $9,6–12,5$  кПа); F4 — цирроз ( $\geq 12,6$  кПа).

Лечение больных ХВГС осуществляли на основании рекомендаций EASL 2016 г. [18]. Все 50 пациентов с проводимой терапией были «наивными» (ранее не лечились противовирусными препаратами) и не имели цирроза печени (стадия F0–F3 по METAVIR). 19 больных с ХВГС имели 1 генотип вируса С (у 11 больных определялся фиброз печени F0–F1 по METAVIR, у 4 лиц — фиброз F2 по METAVIR, у 4 больных — фиброз F3 по METAVIR), у 15 пациентов диагностировался 2 генотип вируса С (у 6 лиц был обнаружен фиброз печени F0–F1 по METAVIR, у 3 пациентов — фиброз F2 по METAVIR и у 6 больных — фиброз F3 по METAVIR), 3 генотип вируса С был выявлен у 16 человек (у 8 пациентов регистрировали фиброз печени F0–F1 по METAVIR, у 3 лиц — фиброз F2 по METAVIR, у 5 больных — фиброз F3 по METAVIR). Все 50 человек получали препараты прямого про-



**Рисунок. Вирусная нагрузка у больных ХВГС с разными генотипами ВГС**

Figure 1. Viral load in patients with CVHC related to various HCV genotypes

тивовирусного действия Софосбувир (400 мг) и Даклатасвир (60 мг) 1 раз в сутки в течение 12 недель. Клинический и лабораторный контроль с определением количества РНК вируса гепатита С методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляли до начала лечения ХВГС, через 4 недели терапии, в момент окончания лечения и через 24 недели после окончания терапии. Приверженность приема препаратов оценивалась с использованием теста Мориски–Грина (Morisky–Green Test) [15].

В контрольную группу вошли 46 практически здоровых лиц, у которых во время профилактического осмотра были исключены выраженные хронические заболевания различных органов и систем, отсутствовали жалобы на состояние

здоровья и определялись соответствовавшие норме показатели клинического и биохимического анализов крови при отсутствии маркеров к вирусным гепатитам В и С, антител к описторхисам; факт злоупотребления алкоголем в анамнезе отрицался.

Определение содержания РНК ВГС осуществляли методом количественной ПЦР в реальном времени на приборе Biorad CFX96 Real Time System (BioRad Laboratories, США) с помощью тест-системы Abbott RealTime HCV test® (Abbott, США). Генотип ВГС определяли с помощью набора VERSANT® HCV Amplification 2.0 (LiPA) (Siemens, Германия). Степень фиброза печени у больных ХВГС оценивали с помощью ультразвуковой эластографии на аппарате FibroScan 502 (Echosens, Франция).

Исследование субпопуляционного состава хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов осуществляли методом прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), APC (allophycocyanin), AA700 (alexa fluor 700) и AA750 (alexa fluor 750) в следующей панели: CD45RO-FITC/CD62L-ECD/CD4-APC/CD3-AA700/CD45-AA750. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствие с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [7]. Пробоподготовку выполняли по стандартной методике [29]. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США)

**Таблица 1. Фенотипический состав CD4+ Т-лимфоцитов у больных ХВГС до лечения в зависимости от генотипа ВГС (Ме [Q1–Q3])**

Table 1. Phenotypic profile of CD4+ T lymphocytes in patients with CVHC before treatment related to HCV genotype (Me [Q1–Q3])

Показатели Parameters	Контроль Control n = 46	Больные ХВГС/Patients with CVHC		
		Генотип 1 Genotype 1 n = 18	Генотип 2 Genotype 2 n = 15	Генотип 3 Genotype 3 n = 17
CD3+CD4+, 10 <sup>9</sup> /L	0,83 (0,56–1,16)	0,94 (0,84–1,15)	0,73 (0,62–0,84)	0,95 (0,80–1,31)
			p <sub>2</sub> = 0,013	p <sub>3</sub> = 0,013
CD3+CD4+CD45RO-CD62L+, %	14,6 (12,4–18,5)	12,0 (8,6–15,6)	14,8 (10,9–19,5)	14,0 (8,4–15,7)
CD3+CD4+CD45RO+CD62L+, %	19,2 (16,7–23,0)	12,4 (11,5–17,4)	12,5 (7,9–15,4)	14,3 (12,1–15,1)
		p <sub>1</sub> < 0,001	p <sub>1</sub> < 0,001	p <sub>1</sub> < 0,001
CD3+CD4+CD45RO+CD62L-, %	10,6 (9,0–13,1)	15,6 (13,1–19,8)	7,8 (6,6–9,0)	12,4 (10,6–16,4)
		p <sub>1</sub> < 0,001	p <sub>1</sub> = 0,010 p <sub>2</sub> < 0,001	p <sub>1</sub> = 0,037 p <sub>3</sub> < 0,001
CD3+CD4+CD45RO-CD62L-, %	0,29 (0,12–0,95)	2,33 (0,84–4,77)	0,70 (0,29–1,38)	1,47 (0,60–2,17)
		p <sub>1</sub> < 0,001	p <sub>2</sub> = 0,021	p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>3</sub> = 0,044

**Примечание.** p<sub>1</sub> — статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p<sub>2</sub> — статистически значимые различия с показателями больных с генотипом 1 ВГС; p<sub>3</sub> — статистически значимые различия с показателями больных с генотипом 2 ВГС.

Note. p<sub>1</sub> — statistically significant differences versus controls; p<sub>2</sub> — statistically significant differences versus patients with genotype 1 HCV; p<sub>3</sub> — statistically significant differences versus patients with genotype 2 HCV.

Центра коллективного пользования КНЦ СО РАН. Обработку полученных цитофлуориметрических результатов осуществляли с помощью программ Navios Software v. 1.2 и Kaluza v. 2.1.1 (Beckman Coulter, США). Т-хелперы (Th) и цитотоксические Т-клетки (Тсyt) в зависимости от уровней экспрессии CD45RO и CD62L разделяли на четыре основные субпопуляции: «наивные» клетки с фенотипом CD45RO<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>, клетки центральной (СМ) и эффекторной (ЕМ) памяти (фенотипы CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> соответственно), а также «терминально-дифференцированные» эффекторные клетки (TEMRA, CD45RO<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>). В каждой пробе анализировали не менее 50 000 лимфоцитов.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни (Mann–Whitney U test). Достоверность различий показателей в группах больных до и после лечения (связанные выборки) определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции

по Спирмену (Spearman rank R). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

## Результаты

Лечение Софосбувиром и Даклатасвиром в течение 12 недель у наивных больных ХВГС без цирроза печени позволило получить 100%-ный устойчивый вирусологический ответ (УВО, определяется через 6 месяцев после окончания лечения) у всех пациентов, принявших участие в исследовании. То есть мы не получили различий в ответе на лечение Софосбувиром и Даклатасвиром у пациентов с 1, 2 и 3 генотипами вируса С.

Вирусная нагрузка у больных ХВГС в зависимости от генотипа ВГС представлена на рис. 1. Обнаружено, что у больных с генотипом 1 ВГС уровень вирусной нагрузки выше, чем у пациентов с генотипами 2 и 3 ВГС. После лечения препаратами прямого противовирусного действия только среди больных с генотипом 2 ВГС обнаружены два пациента, у которых выявляется вирусная нагрузка ( $7,60 \times 10^4$  МЕ/мл и  $1,40 \times 10^6$  МЕ/мл). С помощью теста Мориски–Грина оба пациента были признаны некомплаентными. В связи с этим анализ особенностей фенотипа эффекторных Т-лимфоцитов после лечения для этих двух пациентов не производился.

При исследовании иммунологических показателей у больных ХВГС в зависимости от генотипа ВГС обнаружено, что у пациентов с генотипом 2 ВГС в периферической крови понижено абсолютное количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов относительно уровней, выявленных у больных с генотипами 1 и 3 ВГС (табл. 1). Независимо от генотипа

**Таблица 2. Фенотипический состав CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у больных ХВГС до лечения в зависимости от генотипа ВГС (Me [Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>])**

Table 2. Phenotypic profile of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with CVHC before treatment related to HCV genotype (Me [Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>])

Показатели Parameters	Контроль Control n = 46	Больные ХВГС/Patients with CVHC		
		Генотип 1 Genotype 1 n = 18	Генотип 2 Genotype 2 n = 15	Генотип 3 Genotype 3 n = 17
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /L	0,55 (0,37–0,80)	0,49 (0,42–0,79)	0,67 (0,49–0,78)	0,72 (0,67–1,02)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup> , %	5,9 (3,7–9,1)	7,1 (6,6–8,2)	10,2 (6,7–13,6)	9,1 (6,9–11,5)
			p <sub>1</sub> = 0,021	p <sub>1</sub> = 0,035
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> , %	2,6 (1,8–3,8)	3,7 (2,5–4,8)	5,0 (3,6–6,0)	4,4 (2,3–5,7)
			p <sub>1</sub> = 0,003	p <sub>1</sub> = 0,036
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> , %	8,4 (6,2–11,6)	8,0 (5,9–10,3)	9,8 (7,5–12,6)	8,7 (6,0–13,5)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD62L <sup>-</sup> , %	6,5 (4,1–10,0)	9,7 (5,2–11,5)	6,1 (3,3–10,0)	11,7 (6,1–15,6)
				p <sub>1</sub> = 0,030 p <sub>3</sub> = 0,043

**Примечание.** p<sub>1</sub> — статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p<sub>2</sub> — статистически значимые различия с показателями больных с генотипом 1 ВГС; p<sub>3</sub> — статистически значимые различия с показателями больных с генотипом 2 ВГС.

Note. p<sub>1</sub> — statistically significant differences versus controls; p<sub>2</sub> — statistically significant differences versus patients with genotype 1 HCV; p<sub>3</sub> — statistically significant differences versus patients with genotype 2 HCV.

**Таблица 3. Фенотипический состав CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у больных ХВГС после лечения в зависимости от генотипа ВГС (Ме [Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>])**Table 3. Phenotypic profile of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with CVHC after treatment related to HCV genotype (Ме [Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>])

Показатели Parameters	Контроль Control n = 46	Больные ХВГС/Patients with CVHC		
		Генотип 1 Genotype 1 n = 18	Генотип 2 Genotype 2 n = 15	Генотип 3 Genotype 3 n = 17
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /L	0,83 (0,56–1,16)	3,19 (2,61–3,53)	2,09 (1,71–2,42)	2,70 (2,38–3,02)
		p <sub>1</sub> < 0,001	p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> = 0,019	0,72 (0,67–1,02)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup> , %	14,6 (12,4–18,5)	8,7 (7,1–15,9)	10,7 (7,7–15,1)	10,6 (6,6–13,6)
		p <sub>1</sub> = 0,039		p <sub>1</sub> = 0,041
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> , %	19,2 (16,7–23,0)	13,5 (9,3–16,6)	16,1 (11,1–18,9)	13,8 (12,7–18,9)
		p <sub>1</sub> < 0,001	p <sub>1</sub> = 0,042	p <sub>1</sub> = 0,015
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> , %	10,6 (9,0–13,1)	20,1 (14,2–25,6)	10,3 (8,4–11,7)	12,7 (11,8–15,1)
		p <sub>1</sub> < 0,001	p <sub>2</sub> < 0,001	p <sub>2</sub> = 0,026
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD62L <sup>-</sup> , %	0,29 (0,12–0,95)	1,81 (1,12–2,38)	1,0 (0,5–2,6)	1,0 (0,6–2,1)
		p <sub>1</sub> < 0,001	p <sub>1</sub> = 0,027	p <sub>1</sub> = 0,017

**Примечание.** p<sub>1</sub> — статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p<sub>2</sub> — статистически значимые различия с показателями больных с генотипом 1 ВГС; p<sub>3</sub> — статистически значимые различия с показателями больных с генотипом 2 ВГС.

Note. p<sub>1</sub> — statistically significant differences versus controls; p<sub>2</sub> — statistically significant differences versus patients with genotype 1 HCV; p<sub>3</sub> — statistically significant differences versus patients with genotype 2 HCV.

ВГС у обследованных пациентов процентное количество СМ Th было ниже контрольных значений. Относительное содержание ЕМ Th у больных с генотипом 2 ВГС понижено в сравнении с контрольными величинами, тогда как при генотипах 1 и 3 ВГС выявляется повышение уровня данной фракции клеток. У больных с генотипами 1 и 3 ВГС в крови количество ТЕМРА Th выше контрольного диапазона, в то время как у обследованных пациентов с генотипом 2 ВГС относительный уровень лимфоцитов с данным фенотипом ниже, чем у больных с другими генотипами ВГС.

У больных ХВГС до начала лечения в зависимости от генотипа вируса также выявляются изменения субпопуляционного состава CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (табл. 2). Так, у пациентов с генотипами 2 и 3 ВГС в периферической крови повышается процентное содержание наивных и СМ Тсу<sub>т</sub> относительно контрольных значений. Только у больных с генотипом 3 ВГС уровень содержания зрелых эффекторных клеток популяции ТЕМРА увеличивается относительно контрольного диапазона и уровня, выявленного у пациентов с генотипом 2 ВГС.

**Таблица 4. Субпопуляционный состав CD4<sup>-</sup> Т-лимфоцитов у больных ХВГС после лечения в зависимости от генотипа ВГС (Ме [Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>])**Table 4. Phenotypic profile of CD4<sup>-</sup> T lymphocytes in patients with CVHC after treatment related to HCV genotype (Ме [Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>])

Показатели Parameters	Контроль Control n = 46	Больные ХВГС/Patients with CVHC		
		Генотип 1 Genotype 1 n = 18	Генотип 2 Genotype 2 n = 15	Генотип 3 Genotype 3 n = 17
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> , 10 <sup>9</sup> /L	0,55 (0,37–0,80)	1,63 (1,10–2,28)	2,01 (1,77–2,13)	2,64 (1,47–3,50)
		p <sub>1</sub> < 0,001	p <sub>1</sub> < 0,001	p <sub>1</sub> < 0,001
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup> , %	5,9 (3,7–9,1)	4,7 (3,5–7,9)	5,4 (3,9–9,3)	6,3 (5,1–9,7)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> , %	2,6 (1,8–3,8)	3,4 (2,2–4,9)	4,0 (2,7–7,8)	5,1 (3,4–9,7)
			p <sub>1</sub> = 0,046	p <sub>1</sub> = 0,003
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> , %	8,4 (6,2–11,6)	7,0 (4,0–9,6)	9,5 (7,0–18,8)	8,1 (5,2–15,0)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD62L <sup>-</sup> , %	6,5 (4,1–10,0)	7,6 (2,9–11,5)	9,0 (4,6–18,8)	13,5 (4,6–14,3)
				p <sub>1</sub> = 0,011

**Примечание.** p<sub>1</sub> — статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p<sub>2</sub> — статистически значимые различия с показателями больных с генотипом 1 ВГС; p<sub>3</sub> — статистически значимые различия с показателями больных с генотипом 2 ВГС.

Note. p<sub>1</sub> — statistically significant differences versus controls; p<sub>2</sub> — statistically significant differences versus patients with genotype 1 HCV; p<sub>3</sub> — statistically significant differences versus patients with genotype 2 HCV.

С помощью корреляционного анализа установлено, что у больных с генотипом 1 ВГС со степенью вирусной нагрузки отрицательно взаимосвязан относительный уровень Тh-эффекторной памяти ( $r = -0,53$ ,  $p = 0,030$ ) и положительно — содержание наивных Тh ( $r = 0,58$ ,  $p = 0,014$ ) и наивных Тcyt ( $r = 0,44$ ,  $p = 0,042$ ). У больных с генотипом 2 ВГС со степенью вирусной нагрузки отрицательно коррелируют относительные уровни СМ Тcyt ( $r = -0,62$ ,  $p = 0,043$ ) и TEMRA Тcyt ( $r = -0,68$ ,  $p = 0,037$ ). У пациентов с генотипом 3 ВГС корреляционных взаимосвязей между степенью вирусной нагрузки и субпопуляционным составом Т-лимфоцитов не обнаружено.

После лечения препаратами прямого противовирусного действия у больных ХВГС в периферической крови повышается абсолютное содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов (табл. 3). При этом у больных с генотипом 2 ВГС по сравнению с больными с генотипами 1 и 3 ВГС обнаруживается минимальный уровень клеток с указанным фенотипом. У больных с генотипами 1 и 3 ВГС процентное количество наивных Т-хелперов снижено относительно контрольного диапазона. Независимо от генотипа вируса гепатита С у обследованных пациентов снижается содержание Т-хелперов центральной памяти и повышается уровень «терминально-дифференцированных» Т-хелперов по сравнению с контрольными значениями. Только у больных с генотипом 1 ВГС после проведенного лечения в крови повышается количество ЕМ Тh как относительно контрольного диапазона, так и уровней, выявленных у пациентов с генотипами 2 и 3 ВГС.

После проведенного лечения у больных ХВГС независимо от генотипа ВГС в крови повышается абсолютное количество цитотоксических Т-лимфоцитов (табл. 4). При этом у больных с генотипами 2 и 3 ВГС выявляется повышение процентного содержания СМ Тcyt относительно контрольного диапазона, и только у больных с генотипом 3 ВГС в результате проведенного лечения увеличивается уровень TEMRA Тcyt.

При сравнении субпопуляционного состава Т-лимфоцитов крови у больных ХВГС до и через 3 мес. лечения обнаружено, что у пациентов с генотипом 1 ВГС возрастает абсолютное содержание как Т-хелперов ( $p = 0,028$ ), так и цитотоксических Т-клеток ( $p = 0,027$ ), а также увеличивается процентный уровень TEMRA Тh (см. табл. 1–4). У больных с генотипом 2 ВГС в результате проведенного лечения также увеличивается абсолютное содержание Тh ( $p = 0,015$ ) и Тcyt ( $p = 0,031$ ). Кроме того, у лиц данной группы через 3 мес. лечения наблюдается снижение процентного количества наивных Тcyt ( $p = 0,040$ ) и увеличение содержания зрелых эффекторов популяции TEMRA Тcyt ( $p = 0,029$ ). У больных с генотипом 3 ВГС в результате проведенного лечения выявляется только повышение абсолютного количества Тh ( $p = 0,024$ ) и Тcyt ( $p = 0,009$ ).

## Обсуждение

Высокая эффективность лечения больных с хроническим вирусным гепатитом С препаратами прямого противовирусного действия в нашем исследовании соответствует современным данным. За короткое время произошла революция в терапии данной патологии [21].

В процессе формирования эффекторных субпопуляций Т-лимфоциты проходят два этапа развития: антиген-независимая дифференцировка в тимусе и антиген-зависимая дифференцировка в периферических органах иммунной системы [4, 11]. Первый этап завершается выходом из тимуса в циркуляцию наивных Т-лимфоцитов, на втором этапе (после активации специфическим антигеном и антиген-зависимой дифференцировки) происходит формирование клеток центральной памяти и эффекторной памяти, а также зрелых эффекторных клеток популяции TEMRA [4, 20]. Процесс дифференцировки Т-лимфоцитов можно контролировать по изоформе рецептора CD45, который представляет собой трансмембранный белок с тирозинфосфатазной активностью. Внеклеточная белковая часть CD45 кодируется 7 экзонами. В наивных Т-лимфоцитах в этот участок рецептора входят все домены, что обозначается как CD45RA (с молекулярной массой в 220 kDa). В процессе антиген-зависимой дифференцировки осуществляется альтернативный сплайсинг участков РНК, в результате которого теряется часть внеклеточных доменов молекулы CD45 и она трансформируется через переходные формы в CD45R0 (с молекулярной массой в 180 kDa) [4, 11]. TEMRA Т-лимфоциты также экспрессируют CD45RA [4, 32]. Следовательно, Т-лимфоциты, экспрессирующие CD45R0, определяются как Т-клетки памяти (СМ и ЕМ), тогда как не экспрессирующие данную молекулу относятся к «наивным» и TEMRA.

Другой молекулой, которая экспрессируется на Т-лимфоцитах, определяя их субпопуляцию, является CD62L. Данная молекула является L-селектином, который определяет миграцию клеток в периферические лимфоидные органы, так как его лигандами на эндотелии являются GlyCAM-1 (молекула клеточной адгезии, экспрессированная на эндотелии лимфоузлов), MadCAM-1 (белок эндотелия в лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником) и CD34 (белок эндотелиальных клеток) [4, 6, 24]. Соответственно, CD62L-рецептор экспрессируется на наивных Т-лимфоцитах и СМ-клетках (определяя их миграцию в периферическую лимфоидную ткань) и не экспрессируется на ЕМ-клетках и TEMRA (их функция выполняется вне лимфоидных органов) [6, 20, 32].

Исходя из состава рецепторных молекул на поверхности Т-лимфоцитов, можно определить, что до начала проведения терапии препаратами

прямого противовирусного действия у больных ХВГС с генотипами 1 и 3 ВГС в периферической крови по сравнению с контрольными значениями понижается процентное содержание Т-хелперов СМ и повышается количество ЕМ и TEMRA. Только у больных ХВГС с генотипом 1 ВГС выявляются взаимосвязи между содержанием Т-хелперов и величиной вирусной нагрузки: положительная связана с уровнем наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и отрицательная — с количеством Т-хелперов ЕМ. Данные взаимосвязи отражают развитие следующих механизмов реагирования Т-хелперов на инфекционный процесс. Во-первых, ВГС 1 генотипа стимулирует антиген-независимую дифференцировку Т-хелперов и их выход из тимуса в кровь. При этом экспрессия CD62L-рецептора позволяет им быстро мигрировать в периферическую лимфоидную ткань, что, соответственно, не приводит к повышению их количества в крови. Во-вторых, популяция Т-хелперов ЕМ преимущественно представлена зрелыми эффекторными клетками, которые осуществляют активный синтез и секрецию цитокинов, а также экспрессию на мембране эффекторных молекул [4]. Их количество определяется механизмами антиген-зависимой дифференцировки, причем именно у больных ХВГС с генотипом 1 ВГС обнаружена наиболее выраженная вирусная нагрузка. При генотипе 2 ВГС наблюдаются наиболее низкие значения абсолютного количества Т-хелперов, выявляемые у больных ХВГС, а также понижение уровней CD4<sup>+</sup>-клеток СМ и ЕМ.

Фенотипический состав цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови у больных ХВГС с генотипом 1 ВГС до начала лечения препаратами прямого противовирусного действия аналогичен значениям контрольной группы. Между тем у больных данной группы выявляется положительная корреляционная связь величины вирусной нагрузки с уровнем наивных T<sub>scut</sub>, что, по-видимому, определяется механизмами стимуляции антиген-независимой дифференцировки. При генотипе 2 ВГС выявляется повышение количества наивных и СМ T<sub>scut</sub>. Кроме того, у лиц данной группы обнаружены отрицательные взаимосвязи величины вирусной нагрузки с уровнями СМ и ЕМ T<sub>scut</sub>, что характеризует наличие стимуляции антиген-зависимой дифференцировки и формирования специфического Т-клеточного ответа при инфекционном процессе. У больных с генотипом 3 ВГС до начала проведения терапии препаратами прямого противовирусного действия в крови относительно контрольных значений повышаются уровни наивных T<sub>scut</sub>, СМ и TEMRA. При этом необходимо учитывать, что уровень экспрессии перфоринов и гранзимов в цитотоксических Т-лимфоцитах повышается при их дифференцировке от наивных (минимальное внутриклеточное содержание), через Т-клетки СМ и ЕМ

до TEMRA (максимальное количество) [5]. Следовательно, при генотипе 3 наблюдается наиболее выраженный эффекторный ответ цитотоксических Т-лимфоцитов.

Через 3 месяца лечения препаратами прямого противовирусного действия у больных ХВГС наблюдается повышение абсолютного содержания Т-хелперов в периферической крови (при генотипе 1 ВГС — в 3,4 раза, при генотипе 2 — в 2,9 раза, при генотипе 3 — в 2,8 раза). При этом при генотипе 1 и 3 ВГС выявляется снижение процентного количества наивных Т-хелперов и центральной памяти, но на фоне повышения уровней Т-хелперов ЕМ и TEMRA. У больных с генотипом 2 ВГС после лечения обнаружено снижение уровня Т-хелперов СМ и повышение содержания TEMRA. Кроме того, у больных ХВГС через 3 месяца лечения препаратами прямого противовирусного действия наблюдается повышение абсолютного количества цитотоксических Т-лимфоцитов (при генотипе 1 ВГС — в 3,3 раза, при генотипе 2 — в 3,0 раза, при генотипе 3 — в 3,7 раза). Причем при генотипе 1 ВГС отсутствуют изменения в процентном содержании наивных и эффекторных T<sub>scut</sub> относительно контрольных значений (как и до лечения). При генотипе 2 ВГС у больных после лечения обнаружено снижение содержания наивных T<sub>scut</sub> и повышение уровня TEMRA относительно показателей, которые выявлялись у данной группы обследованных до лечения. У больных ХВГС с генотипом 3 ВГС после терапии препаратами прямого противовирусного действия сохраняются особенности соотношения эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов, которые выявлялись до лечения: повышение процентного количества цитотоксических Т-клеток СМ и TEMRA.

Изменение в количестве эффекторных субпопуляций Т-лимфоцитов в крови у больных ХВГС до и после лечения препаратами прямого противовирусного действия также можно рассматривать с позиций концепции иммунного истощения. В настоящее время под иммунным истощением понимается снижение количества или функциональной активности антиген-специфических Т-лимфоцитов в условиях длительной персистенции антигена [10]. Показано, что при ХВГС повышается уровень апоптоза Т-лимфоцитов, снижается цитокин-продуцирующая активность CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, а также киллерная активность цитотоксических Т-лимфоцитов [14, 27]. В нашем исследовании у больных ХВГС до начала лечения препаратами прямого противовирусного действия, исходя из количественного состава эффекторных Т-лимфоцитов в крови, выраженного иммунного истощения не обнаружено, в частности уровень TEMRA Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов либо соответствует контрольным значениям, либо превы-

шает их. Единственным показателем, который в крови больных ХВГС независимо от генотипа ВГС снижен по сравнению с контрольным диапазоном, является процентное содержание СМ Т-хелперов. Наихудший вариант обнаружен при генотипе 2 ВГС: у пациентов данной группы относительно контрольного диапазона и показателей больных с генотипом 1 и 3 ВГС понижено содержание ЕМ Th. Через 3 месяца лечения пониженный уровень СМ Th в крови у больных ХВГС сохраняется, при этом у пациентов с генотипами 1 и 3 ВГС выявляется снижение количества наивных Т-хелперов. У больных с генотипами 2 и 3 ВГС содержание наивных Тсyt становится равным контрольным значениям. Можно предположить, что до начала лечения у больных ХВГС состояние иммунного истощения преимущественно определялось не количественными изменениями эффекторных Т-лимфоцитов в крови, а их функциональной активностью. После лечения количество пониженных относительно нормы показателей возрастает, тогда как выраженного увеличения уровней эффекторных субпопуляций Т-лимфоцитов не выявляется. Следовательно, на фоне элиминации ВГС восстановления реактивности иммунной системы не наблюдается.

## Заключение

Нами получен 100% УВО у «наивных» больных с 1, 2 и 3 генотипами ХВГС без признаков цирроза печени при применении терапии Софосбувиром (400 мг) и Даклатасвиром (60 мг) в течение 12 недель. У больных ХВГС в зависимости от генотипа ВГС обнаружены характерные особенности в фенотипическом составе эффекторных Т-лимфоцитов до и после лечения препаратами прямого противовирусного действия. При генотипах 1 и 3 ВГС у больных повышалось содержание Т-хелперов ЕМ и ТЕМРА. Только у пациентов с генотипом 2 ВГС в крови снижался уровень Т-хелперов ЕМ. Независимо от генотипа ВГС было снижено относительное количество Т-хелперов СМ. Уровень эффекторных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов у боль-

ных ХВГС соответствовал контрольным значениям или превышал их в зависимости от генотипа ВГС. У больных с генотипом 1 ВГС уровень всех исследуемых субпопуляций эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов был равен контрольным значениям. У пациентов с генотипом 2 ВГС в периферической крови повышалось количество наивных и СМ цитотоксических Т-клеток. У больных с генотипом 3 ВГС в крови было увеличено содержание наивных цитотоксических Т-лимфоцитов, СМ и ТЕМРА. Необходимо отметить, что наибольшая вирусная нагрузка выявлялась у больных ХВГС с генотипом 1 ВГС. Только у этой группы больных количество наивных Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов в крови было положительно взаимосвязано с уровнем вирусной нагрузки. У пациентов с генотипом 2 ВГС содержание Т-хелперов СМ и ЕМ отрицательно коррелировало с уровнем вирусной нагрузки. В то же время фиброз печени был наиболее выражен у больных ХВГС с генотипами 2 и 3 ВГС: фиброз тяжелой степени у данных групп больных выявлялся в 37,5 и 38,4% соответственно, против 23,1% у пациентов с генотипом 1 ВГС. Через 3 месяца лечения препаратами прямого противовирусного действия у больных ХВГС независимо от генотипа ВГС сохранялось сниженное содержание Т-хелперов СМ. Кроме этого, у пациентов с генотипами 1 и 3 ВГС выявлялось понижение количества наивных Т-хелперов, а у больных с генотипами 2 и 3 ВГС наблюдалась нормализация содержания наивных цитотоксических Т-лимфоцитов. Предполагается, что до начала лечения препаратами прямого противовирусного действия состояние иммунного истощения, связанного с длительной персистенцией вируса в организме, преимущественно определяется сниженной функциональной активностью эффекторных субпопуляций Т-лимфоцитов, а не их количеством. Однако концепция иммунного истощения подтверждается состоянием Т-клеточного иммунитета у больных ХВГС после лечения: через 3 месяца эффективной терапии (практически при полной элиминации вируса из организма) восстановления иммунной системы не происходит.

## Список литературы/References

1. Борисов А.Г., Савченко А.А., Кудрявцев И.В. Особенности иммунного реагирования при вирусных инфекциях // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 2. С. 148–156. [Borisov G.A., Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V. Features of the immune response during viral infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 2, pp. 148–156. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2015-2-148-156
2. Борисов А.Г., Савченко А.А., Тихонова Е.П. Современные методы лечения вирусного гепатита С. Красноярск: НИИ медицинских проблем Севера, 2017. 74 с. [Borisov A.G., Savchenko A.A., Tikhonova E.P. Modern methods of treating viral hepatitis C. *Krasnoyarsk: Research Institute of Medical Problems of the North*, 2017. 74 p. (In Russ.)]
3. Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Эсауленко Е.В., Басина В.В., Тотолян А.А. Анализ субпопуляций Т-хелперов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6 и активационные маркеры CD38 и HLA-DR // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 4. С. 327–334. [Elezov D.S., Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Semenov A.V., Esaulenko E.V., Basina V.V., Totolian A.A. Analysis of T-helper subsets of peripheral blood of patients with chronic hepatitis C expressing chemokine receptors CXCR3 and CCR6 and activation markers CD38 and HLA-DR. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 4, pp. 327–334. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2013-4-327-334

4. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: Уральское отделение РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in biomedical research. *Yekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018. 720 p. (In Russ.)*]
5. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Васильева Е.В., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян Арег А. Фенотипическая характеристика цитотоксических Т-лимфоцитов: регуляторные и эффекторные молекулы // Медицинская иммунология. 2018. Т. 20, № 2. С. 227–240. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Vasilyeva E.V., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebriakova M.K., Totolian Areg A. Phenotypic characterisation of peripheral blood cytotoxic T lymphocytes: regulatory and effector molecules. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2018, vol. 20, no. 2, pp. 227–240. (In Russ.)* doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-227-240
6. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии // Медицинская иммунология. 2015, Т. 17, № 6. С. 525–538. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebriakova M.K. Multicolor flow cytometric analysis of cytotoxic T cell subsets. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2015, vol. 17, no. 6, pp. 525–538. (In Russ.)* doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-525-538
7. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 1. С. 19–26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2015, vol. 17, no. 1, pp. 19–26. (In Russ.)* doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26
8. Орлова С.Н., Басханова М.В. Эффективность противовирусной терапии хронического гепатита С у пациентов с недифференцированной дисплазией соединительной ткани // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2019. № 2. С. 61–67. [Orlova S.N., Baskhanova M.V. Efficiency of antiviral therapy for chronic hepatitis c in patients with undifferentiated connective tissue dysplasia. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases, 2019, no. 2, pp. 64–67. (In Russ.)* doi: 10.18565/epidem.2019. 2.61-67
9. Щаницына С.Е., Бурневич Э.З., Никулкина Е.Н., Филатова А.Л., Моисеев С.В., Мухин Н.А. Факторы риска неблагоприятного прогноза хронического гепатита С // Терапевтический архив. 2019. Т. 91, № 2. С. 59–66. [Shchanitsyna S.E., Burnevich E.Z., Nikulkina E.N., Filatova A.L., Moiseev S.V., Mukhin N.A. Risk factors of unfavorable prognosis of chronic hepatitis C. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive, 2019, vol. 91, no. 2, pp. 59–66. (In Russ.)* doi: 10.26442/ 00403660. 2019.02.000082
10. Южанинова С.В., Сайдакова Е.В. Феномен иммунного истощения // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137, № 1. С. 70–83. [Yuzhaninova S.V., Saidakova E.V. Immune exhaustion. *Uspekhi sovremennoy biologii = Advances in Modern Biology, 2017, vol. 137, no. 1, pp. 70–83. (In Russ.)*]
11. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunologiya. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p. (In Russ.)]
12. Ahmed M. Era of direct acting anti-viral agents for the treatment of hepatitis C. *World J. Hepatol., 2018, vol. 10, no. 10, pp. 670–684. doi: 10.4254/wjh.v10.i10.670*
13. Aregay A., Owusu Sekyere S., Deterding K., Port K., Dietz J., Berkowski C., Sarrazin C., Manns M.P., Cornberg M., Wedemeyer H. Elimination of hepatitis C virus has limited impact on the functional and mitochondrial impairment of HCV-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J. Hepatol., 2019, vol. 71, no. 5, pp. 889–899. doi: 10.1016/j.jhep.2019.06.025*
14. Barathan M., Mohamed R., Yong Y.K., Kannan M., Vadivelu J., Saeidi A., Larsson M., Shankar E.M. Viral persistence and chronicity in hepatitis C virus infection: role of T-cell apoptosis, senescence and exhaustion. *Cells, 2018, vol. 7, no. 10: E165. doi: 10.3390/cells7100165*
15. Ben A.J., Neumann C.R., Mengue S.S. The brief medication questionnaire and Morisky–Green test to evaluate medication adherence. *Rev. Saude Publica, 2012, vol. 46, no. 2, pp. 279–289. doi: 10.1590/s0034-89102012005000013*
16. Cuypers L., Ceccherini-Silberstein F., Van Laethem K., Li G., Vandamme A.M., Rockstroh J.K. Impact of HCV genotype on treatment regimens and drug resistance: a snapshot in time. *Rev. Med. Virol., 2016, vol. 26, no. 6, pp. 408–434. doi: 10.1002/rmv.1895*
17. Deming P., Martin M.T., Chan J., Dilworth T.J., El-Lababidi R., Love B.L., Mohammad R.A., Nguyen A., Spooner L.M., Wortman S.B. Therapeutic advances in HCV genotype 1 infection: insights from the society of infectious diseases pharmacists. *Pharmacotherapy, 2016, vol. 36, no. 2, pp. 203–217. doi: 10.1002/phar.1700*
18. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2016. *J. Hepatol., 2017, vol. 66, no. 1, pp. 153–194. doi: 10.1016/j.jhep.2016.09.001*
19. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *J. Hepatol., 2018, vol. 69, no. 2, pp. 461–511. doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.026*
20. Egui A., Ledesma D., Pérez-Antón E., Montoya A., Gómez I., Robledo S.M., Infante J.J., Vélez I.D., López M.C., Thomas M.C. Phenotypic and functional profiles of antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T Cells associated with infection control in patients with cutaneous leishmaniasis. *Front. Cell Infect. Microbiol., 2018, vol. 8: 393. doi: 10.3389/fcimb.2018.00393*
21. Ghany M.G., Morgan T.R.; AASLD-IDSА Hepatitis C Guidance Panel. Hepatitis C Guidance 2019 Update: American Association for the study of Liver Diseases-Infectious Diseases Society of America recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C virus infection. *Hepatology, 2020, vol. 71, no. 2, pp. 686–721. doi: 10.1002/hep.31060*
22. Lin M., Kramer J., White D., Cao Y., Tavakoli-Tabasi S., Madu S., Smith D., Asch S.M., El-Serag H.B., Kanwal F. Barriers to hepatitis C treatment in the era of direct-acting anti-viral agents. *Aliment Pharmacol. Ther., 2017, vol. 46, no. 10, pp. 992–1000. doi: 10.1111/apt.14328*
23. Luxenburger H., Neumann-Haefelin C., Thimme R., Boettler T. HCV-specific T cell responses during and after chronic HCV infection. *Viruses, 2018, vol. 10, no. 11: E645. doi: 10.3390/v10110645*
24. Mangare C., Tischer-Zimmermann S., Riese S.B., Dragon A.C., Prinz I., Blasczyk R., Maecker-Kolhoff B., Eiz-Vesper B. Robust identification of suitable T-cell subsets for personalized CMV-specific T-cell immunotherapy using CD45RA and CD62L microbeads. *Int. J. Mol. Sci., 2019, vol. 20, no. 6: E1415. doi: 10.3390/ijms20061415*
25. Modin L., Arshad A., Wilkes B., Benselin J., Lloyd C., Irving W.L., Kelly D.A. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection among children and young people. *J. Hepatol., 2019, vol. 70, no. 3, pp. 371–378. doi: 10.1016/j.jhep.2018.11.013*
26. Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol., 2017, vol. 2, no. 3, pp. 161–176. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30181-9*

27. Saeidi A., Zandi K., Cheok Y.Y., Saeidi H., Wong W.F., Lee C.Y.Q., Cheong H.C., Yong Y.K., Larsson M., Shankar E.M. T-cell exhaustion in chronic infections: reversing the state of exhaustion and reinvigorating optimal protective immune responses. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 2569. doi: 10.3389/fimmu.2018.02569
28. Stevenson T.J., Barbour Y., McMahon B.J., Townshend-Bulson L., Hewitt A.M., Espera H.G.F., Homan C., Holck P., Luna S.V., Knall C., Simons B.C. Observed changes in natural killer and T cell phenotypes with evaluation of Immune outcome in a longitudinal cohort following Sofosbuvir-based therapy for chronic hepatitis C infection. *Open Forum Infect. Dis.*, 2019, vol. 6, no. 6: ofz223. doi: 10.1093/ofid/ofz223
29. Sutherland D.R., Ortiz F., Quest G., Illingworth A., Benko M., Nayyar R., Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2018, vol. 94, no. 4, pp. 637–651. doi: 10.1002/cyto.b.21626
30. Telatin V., Nicoli F., Frasson C., Menegotto N., Barbaro F., Castelli E., Erne E., Palù G., Caputo A. in chronic hepatitis C infection, myeloid-derived suppressor cell accumulation and T cell dysfunctions revert partially and late after successful direct-acting antiviral treatment. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2019, vol. 9: 190. doi: 10.3389/fcimb.2019.00190
31. Valadkhan S., Fortes P. Regulation of the interferon response by lncRNAs in HCV infection. *Front. Microbiol.* 2018, vol. 9: 181. doi: 10.3389/fmicb.2018.00181
32. Weltevrede M., Eilers R., de Melker H.E., van Baarle D. Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: a systematic review. *Exp. Gerontol.*, 2016, vol. 77, pp. 87–95. doi: 10.1016/j.exger.2016.02.005
33. Younossi Z., Papatheodoridis G., Cacoub P., Negro F., Wedemeyer H., Henry L., Hatzakis A. The comprehensive outcomes of hepatitis C virus infection: a multi-faceted chronic disease. *J. Viral. Hepat.*, 2018, vol. 25, no. 3, pp. 6–14. doi: 10.1111/jvh.13005
34. Zhao J., Dang X., Zhang P., Nguyen L.N., Cao D., Wang L., Wu X., Morrison Z.D., Zhang Y., Jia Z., Xie Q., Wang L., Ning S., El Gazzar M., Moorman J.P., Yao Z.Q. Insufficiency of DNA repair enzyme ATM promotes naive CD4 T-cell loss in chronic hepatitis C virus infection. *Cell Discov.*, 2018, vol. 4: 16. doi: 10.1038/s41421-018-0015-4

**Авторы:**

**Савченко А.А.**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

**Цуканов В.В.**, д.м.н., профессор, зав. клиническим отделением патологии пищеварительной системы ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

**Кудрявцев И.В.**, к.б.н., зав. лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

**Тонких Ю.Л.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник отделения патологии пищеварительной системы ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

**Беленюк В.Д.**, младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

**Черепнин М.А.**, младший научный сотрудник отделения патологии пищеварительной системы ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

**Анисимова А.А.**, младший научный сотрудник отделения патологии пищеварительной системы ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

**Борисов А.Г.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия.

**Authors:**

**Savchenko A.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Cellular-Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Tsukanov V.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Clinical Department of Digestive System Pathology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Kudryavtsev I.V.**, PhD (Biology), Head of the Cell Immunology Laboratory, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Assistant Professor, Department of Immunology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Tonkih J.L.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Clinical Department of Digestive System Pathology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Belenjuk V.D.**, Junior Researcher, Laboratory of Cellular-Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Cherepnin M.A.**, Junior Researcher, Clinical Department of Digestive System Pathology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Anisimova A.A.**, Junior Researcher, Clinical Department of Digestive System Pathology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Borisov A.G.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Cellular-Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.07.2020  
Отправлена на доработку 27.03.2021  
Принята к печати 31.10.2021

Received 26.07.2020  
Revision received 27.03.2021  
Accepted 31.10.2021

# ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ КРОВИ НА ТЕЧЕНИЕ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С COVID-19

И.Э. Ходза<sup>1</sup>, П.Д. Пуздряк<sup>1,2</sup>, П.Б. Бондаренко<sup>1</sup>, А.М. Дегтярев<sup>1</sup>, А.А. Ерофеев<sup>1</sup>,  
К.А. Чижова<sup>2</sup>, В.В. Шломин<sup>1</sup>, Е.С. Ведерникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Пандемия XXI века, вызванная вирусом SARS-CoV-2, поставила сложные задачи перед мировым медицинским сообществом. Внебольничная полисегментарная пневмония, вызванная новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), протекает по-разному и может осложниться потенциально летальной реакцией иммунной системы — цитокиновым штормом. Подобный иммунный ответ характеризуется быстрой пролиферацией и повышенной активностью Т-клеток, макрофагов и естественных киллеров с высвобождением защитными клетками различных воспалительных цитокинов и химических медиаторов. Такое патологическое состояние может быть купировано путем введения рекомбинантного гуманизированного моноклонального антитела к человеческому рецептору IL-6 — монофункционального цитокина. Эффект блокаторов IL-6 заключается в селективном связывании и подавлении как растворимых, так и мембранных рецепторов IL-6 (sIL-6R и mIL-6R). Существуют исследования, демонстрирующие положительное влияние и повышение уровня выживаемости при использовании препаратов, блокирующих выработку IL-6. Новая коронавирусная инфекция способна вызывать воспаление стенки артерии с развитием внутрисосудистого тромбообразования, что обосновывает высокую эффективность лечения антикоагулянтами и гормонотерапией. В стандарты медикаментозного лечения изучаемой нами инфекции входят противовирусная, противовоспалительная, антикоагулянтная, муколитическая, симптоматическая, внутривенная инфузионная терапия и оксигенотерапия. Методические рекомендации по диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции, разработанные Минздравом РФ, регулярно обновляются в соответствии с накоплением положительных результатов лечения мировым и локальными медицинскими сообществами. Помимо лекарственной терапии существуют и иные методы детоксикации организма. К одному из дополнительных методов лечения внебольничной пневмонии на фоне протекающего вирусного «васкулита» и коррекции иммунного ответа может относиться ультрафиолетовое облучение крови (далее — УФОК). Общеизвестно, что ультрафиолетовое излучение обладает обеззараживающим эффектом. Применяемые в УФОК длины волны эффективно поглощаются молекулами ДНК патогена. Бактерицидное УФ-излучение на определенных длинах волн вызывает димеризацию тимина в молекулах ДНК. Накопление таких изменений в ДНК микроорганизмов приводит к замедлению темпов их размножения и вымиранию. Для метода фотогемокоррекции характерны иммуностимулирующий, противо-

## Адрес для переписки:

Пуздряк Петр Дмитриевич  
194354, Россия, Санкт-Петербург, пер. Учебный, 5,  
СПб ГБУЗ Городская многопрофильная больница № 2.  
Тел.: 8 911 980-11-70.  
E-mail: hirurg495@yandex.ru

## Contacts:

Petr D. Puzdryak  
194354, Russian Federation, St. Petersburg, Uchebny lane, 5,  
City Multiservice Hospital No. 2.  
Phone: +7 911 980-11-70.  
E-mail: hirurg495@yandex.ru

## Для цитирования:

Ходза И.Э., Пуздряк П.Д., Бондаренко П.Б., Дегтярев А.М.,  
Ерофеев А.А., Чижова К.А., Шломин В.В., Ведерникова Е.С. Влияние  
ультрафиолетового облучения крови на течение внебольничной  
пневмонии, ассоциированной с COVID-19 // Инфекция и иммунитет.  
2021. Т. 11, № 6. С. 1152–1158. doi: 10.15789/2220-7619-IOU-1610

## Citation:

Khodza I.E., Puzdryak P.D., Bondarenko P.B., Degtyarev A.M., Erofeev A.A.,  
Chizhova K.A., Shlomin V.V., Vedernikova E.S. Influence of ultraviolet blood  
irradiation on COVID-19 associated community-acquired pneumonia //  
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021,  
vol. 11, no. 6, pp. 1152–1158. doi: 10.15789/2220-7619-IOU-1610

воспалительный, антигипоксический, мембраностабилизирующий, антиоксидантный и детоксицирующий эффекты. В настоящем исследовании получены данные о достоверном снижении системной воспалительной реакции в виде значительного и быстрого уменьшения уровня СРБ в крови у пациентов на фоне ультрафиолетового облучения крови. Купирование системной воспалительной реакции положительно сказалось на уменьшении инфильтративных изменений в легочной ткани, а также на сроках выписки.

**Ключевые слова:** ультрафиолетовое облучение крови, новая коронавирусная инфекция, лечение COVID-19, внебольничная вирусная пневмония, пандемия XXI века.

## INFLUENCE OF ULTRAVIOLET BLOOD IRRADIATION ON COVID-19 ASSOCIATED COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA

Khodza I.E.<sup>a</sup>, Puzdryak P.D.<sup>a,b</sup>, Bondarenko P.B.<sup>a</sup>, Degtyarev A.M.<sup>a</sup>, Erofeev A.A.<sup>a</sup>, Chizhova K.A.<sup>b</sup>, Shlomin V.V.<sup>a</sup>, Vedernikova E.S.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> City Multiservice Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** The pandemic of the 21<sup>st</sup> century caused by the SARS-CoV-2 virus has posed a challenge for the global medical community. Community-acquired polysegmental pneumonia caused by the novel coronavirus infection (COVID-19) proceeds in a variety of types and may be complicated by a potentially lethal immune response — the cytokine storm. The latter is characterized by rapid proliferation and increased activity of T cells, macrophages and natural killer cells releasing various inflammatory cytokines and chemical mediators by protective cells. This pathological condition can be treated by recombinant humanized monoclonal antibody against monofunctional cytokine human interleukin-6 receptor. The effect of IL-6 blockers is to selectively bind and inhibit both soluble and membrane IL-6 receptors (sIL-6R and mIL-6R). There are studies demonstrating a positive effect and increased survival rate while using drugs that block the production of interleukin-6. The new coronavirus infection causes inflammation of the artery wall with intravascular thrombogenesis, which justifies the high efficiency of anticoagulant and hormone therapy. The standards of drug treatment of the studied infection include antiviral, anti-inflammatory, anticoagulant, mucolytic, symptomatic, intravenous infusion and oxygen therapy. Methodological recommendations for the diagnosis and treatment of a new coronavirus infection, issued by the Ministry of Health of the Russian Federation, are regularly updated in accordance with the accumulation of positive treatment results by global and local medical communities. In addition to drug therapy, there are other methods of body detoxification. One of the additional methods for treatment of community-acquired pneumonia along with viral “vasculitis” and correction of the immune response can be provided by ultraviolet blood irradiation (UBI). It is well known that ultraviolet radiation has a disinfecting effect. The wavelengths used in UBI affect the efficiency of UV absorption by DNA molecules of the pathogen. Bactericidal UV radiation at certain wavelengths causes thymine dimerization in DNA molecules. The accumulation of such changes in the DNA of microorganisms leads to a slowdown in the rate of their reproduction and extinction. The photohemocorrection method is characterized by immunostimulatory, anti-inflammatory, anti-hypoxic, membrane stabilizing, antioxidant and detoxifying effects. In the current study we obtained data on a significant decrease in the systemic inflammatory response, marked and fast decrease of the C-reactive protein in blood tests of patients while receiving ultraviolet blood irradiation. The relief of the systemic inflammatory reaction had a positive effect on the reduction of infiltrative changes in the lung tissue, as well as the timing of discharge from hospital.

**Key words:** ultraviolet blood irradiation, new coronavirus infection, COVID-19 treatment, community-acquired viral pneumonia, 21<sup>st</sup> century pandemic.

## Введение

Способность вируса SARS-CoV-2 вызывать воспаление стенки артерии и повышение уровня воспалительных цитокинов, приводящее к внутрисосудистому тромбообразованию, вплоть до развития синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания, привело к необходимости назначения многокомпонентной антикоагулянтной, гормональной, специфической противовоспалительной терапии, а также противовирусных лекарственных препаратов, направленных на подавление процессов репликации и разрушение вирусных

частиц [5, 6, 7, 9]. Однако помимо медикаментозной терапии существуют и другие методы детоксикации организма, в том числе основанные на использовании физических факторов.

Общеизвестно, что ультрафиолетовое облучение обладает способностью разрушать вирусы и бактерии. Ультрафиолетовое облучение крови (УФОК) — метод гемокоррекции, заключающийся в экстра- или интракорпоральном воздействии на кровь квантами оптического излучения ультрафиолетовой части спектра. Метод УФОК применяется в медицине более 90 лет. В 1928 г. Hancock V. и Knott E. впервые выполнили несколько сеансов экстракорпорального

УФОК родильнице, погибающей от сепсиса, и в результате проводимого лечения больная выздоровела [2].

В СССР этот метод лечения больных впервые был применен ленинградскими трансфузиологами А.Н. Филатовым и Г.И. Касумовым в 1937 г., а в 1979 г. в Ленинградском государственном оптическом институте им. С.И. Вавилова учеными Ю.В. Поповым и Л.М. Кукуем был разработан аппарат «Изольда» (МД-73), который является прототипом широко используемого врачами до настоящего времени аппарата ОВК-03 [3].

К лечебным эффектам УФОК относят нормализацию сна, повышение аппетита, уменьшение лихорадки, признаков интоксикации и гипоксии, уменьшение воспалительного процесса, ишемических болей, улучшение периферического и коронарного кровообращения

и трофики тканей, стимуляцию регенераторных процессов. Отмечались увеличение содержания гемоглобина и эритроцитов в периферической крови, повышение показателей иммунитета и неспецифической резистентности организма, нормализация углеводного, жирового и белкового обменов, улучшение реологических свойств крови и микроциркуляции, улучшение фильтрационной способности почек [3]. Коплатадзе А.М. и соавт. описывают противовирусный, бактерицидный и бактериостатический эффекты ультрафиолетового облучения крови [4]. Подобные эффекты применения УФО крови явились причиной ее применения в лечении пациентов с COVID-19-ассоциированной внебольничной пневмонией.

## Материалы и методы

В период с 1 марта по 20 июля 2020 года лечебно-профилактическое учреждение СПб ГБУЗ ГМПБ № 2 было перепрофилировано под лечение инфекционных больных. Госпитализированные пациенты получали лечение согласно временным методическим рекомендациям по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

На отделении гравитационной хирургии крови было проведено исследование, в которое вошло 70 пациентов с внебольничной двусторонней полисегментарной вирусной пневмонией, ассоциированной с COVID-19 [33 мужчины (47%) и 37 женщин (53%)]. Критерием включения в исследование являлось средне-тяжелое течение заболевания, наличие лихорадки в анамнезе ( $> 38^{\circ}\text{C}$ ), повышение уровня С-реактивного белка (СРБ), подтвержденная методом КТ пневмония. Средний возраст пациентов составил  $61 \pm 13$  лет. В первую группу были включены 35 пациентов, которым проводилась рекомендованная схема лечения, дополненная процедурой УФОК. Во вторую группу вошло 35 пациентов, которые получали стандартную рекомендованную терапию. Исследуемые больные в обеих группах были схожи по тяжести течения заболевания, их характеристика представлена в табл. 1.

В качестве терапии в группах использовались противовирусные и антибактериальные препараты, низкомолекулярные антикоагулянты, внутривенная инфузия физиологического раствора с дексаметазоном. При неэффективности проводимой терапии и развитии цитокинового шторма применялись стандартные схемы лечения лопинавиром/ритонавиром, гидроксихлорохином, а также, в ряде случаев, блокаторами цитокинового шторма.

*Методика выполнения УФО крови.* Все пациенты получали лечебное УФО крови на аппарате «Иволга-ОМС-01». Механизм лечебного воз-

**Таблица 1. Клиническая характеристика исследуемых пациентов**

Table 1. Clinical characteristics of studied patients

Характеристика Characteristics	Группа 1 Group 1 (n = 35)	Группа 2 Group 2 (n = 35)	p
<b>Возраст, лет</b> Age, years	64±12	61±10	0,3
<b>Мужской пол</b> Male	13 (37%)	20 (57%)	0,09
<b>Гипертоническая болезнь II–III ст.</b> Hypertensive disease (II–III stage)	21 (60%)	19 (52%)	0,6
<b>Ишемическая болезнь сердца</b> Coronary heart disease	15 (43%)	12 (34%)	0,4
<b>Стенокардия напряжения II–III ф. кл.</b> Angina pectoris (II–III functional class)	6 (17%)	3 (7%)	0,3
<b>Постинфарктный кардиосклероз</b> Postinfarction cardiosclerosis	3 (8%)	2 (6%)	0,6
<b>Цереброваскулярная болезнь</b> Cerebrovascular disease	9 (25%)	7 (20%)	0,5
<b>Сахарный диабет II типа</b> Type II diabetes mellitus	7 (20%)	4 (11%)	0,3
<b>Мерцательная аритмия</b> Atrial fibrillation	6 (17%)	5 (14%)	0,7
<b>Тяжелое течение заболевания</b> Severe course of the disease	15 (43%)	12 (34%)	0,8
<b>Картина КТ-3</b> CT scan 3	24 (68%)	22 (62%)	0,6
<b>СРБ при поступлении, мг/дл</b> CRP on admission, mg/dl	11±7	10±6	0,2

действия заключался в стимуляции процессов перекисного окисления липидов в клеточных мембранах, активизации антиоксидантной системы, увеличения кислородной емкости крови, а также достижения бактерицидного и витаминизирующего действия и повышения общей иммунорезистентности организма.

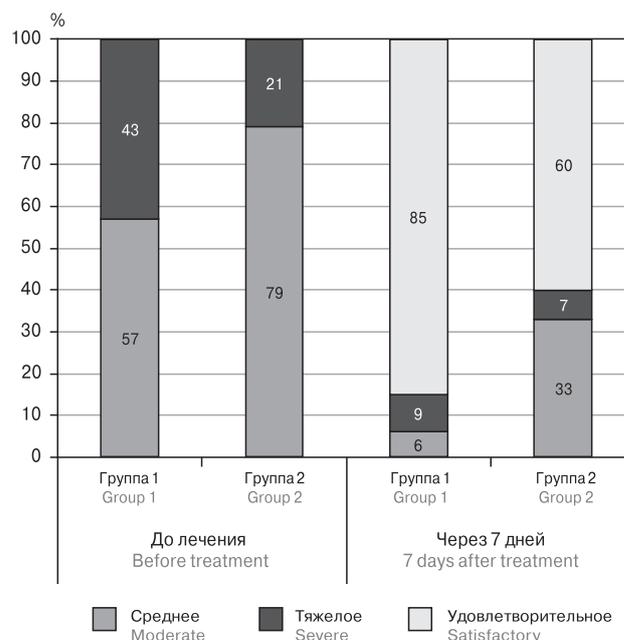
Перед принятием решения о проведении процедуры исключались противопоказания к ее выполнению: все виды доброкачественных и злокачественных опухолей, злокачественные заболевания крови, активные формы туберкулеза, острые расстройства мозгового кровообращения, тяжелый некомпенсированный сахарный диабет.

Процедура заключалась в интракорпоральном облучении крови путем введения одноканального стерильного катетера через пункционную иглу или центральный катетер непосредственно в кровеносное русло в положении лежа на спине. Во время сеанса использовалось 2 диапазона излучения: 240–300 нм — короткий ультрафиолет и 300–400 нм — длинный ультрафиолет. Длительность облучения составляла 15 мин за 1 сеанс, в среднем одному пациенту выполнялось 3 сеанса.

**Статистический анализ.** Результаты были разнесены по шкале среднеарифметических значений (mean) ± стандартное отклонение (SD). Разницу в категориальных переменных анализировали посредством  $\chi^2$ -критерия Пирсона и F-критерия Фишера, количественные данные — с помощью U-критерия Манна–Уитни для непарных сравнений. Статистическую значимость принимали при  $p < 0,01$ . При анализе использовали пакет программ SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## Результаты

В результате дополнения схемы лечения методом УФОК отмечено сокращение пребывания пациента в больнице с  $18 \pm 7$  до  $11 \pm 9$  койко-дней ( $p = 0,07$ ). У пациентов из первой группы наблюдалось улучшение состояния в виде отсутствия лихорадки после первого сеанса в 85%



**Рисунок 1. Стабилизация состояния пациентов в течение 7 дней с момента поступления в стационар в исследуемых группах**

Figure 1. Stabilization of patient condition 7 days after admission to the hospital in the study groups

случаев ( $n = 30$ ), у трех пациентов улучшение выявлено в течение первой недели после проведения курса УФОК (рис. 1).

Состояние пациентов первой группы отмечалось как удовлетворительное в среднем через 6 суток после начала выполнения УФОК. Такое улучшение зарегистрировано у 85% пациентов первой группы. Во второй группе среднее время стабилизации состояния и снижения тяжести течения болезни после проведения курса терапии составило 8 дней. Подобные улучшения отмечались только у 60% пациентов второй группы, тогда как остальным требовалась дополнительная коррекция терапии.

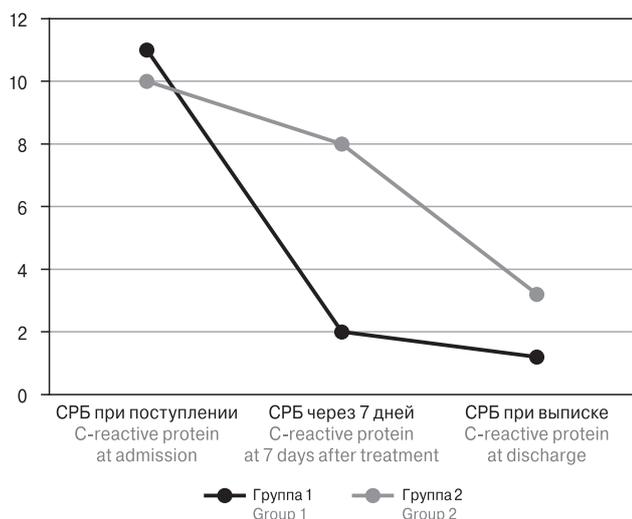
При оценке динамики уровня СРБ выявлено его значимое снижение в течение 7 дней после начала проведения медикаментозной терапии с дополнением ее курсом УФОК с  $11,5 \pm 7,1$  до  $2,1 \pm 3,2$  ( $p < 0,001$ ), в отличие от группы контроля, где

**Таблица 2. Динамика снижения СРБ в исследуемых группах**

Table 2. Dynamics of CRP reduction in the study groups

Показатели Indicators	Группы Groups	До лечения Before treatment	Через 7 дней 7 days after treatment	p	При выписке At discharge from hospital	p
СРБ, усл.ед. CRP, units	1-я (CPT + УФОК) 1 <sup>st</sup> (SRT + UBI)	11,5±7,1	2,1±3,2	0,001	1,2±4,1	0,06
	2-я (CPT) 2 <sup>nd</sup> (SRT)	10±6,6	8,1±7,1		3,2±6,7	

**Примечание.** CPT — стандартная рекомендованная терапия, СРБ — С-реактивный белок, УФОК — ультрафиолетовое облучение крови.  
Note. SRT — Standard recommended therapy, CRP — C-reactive protein, UBI — ultraviolet blood irradiation.



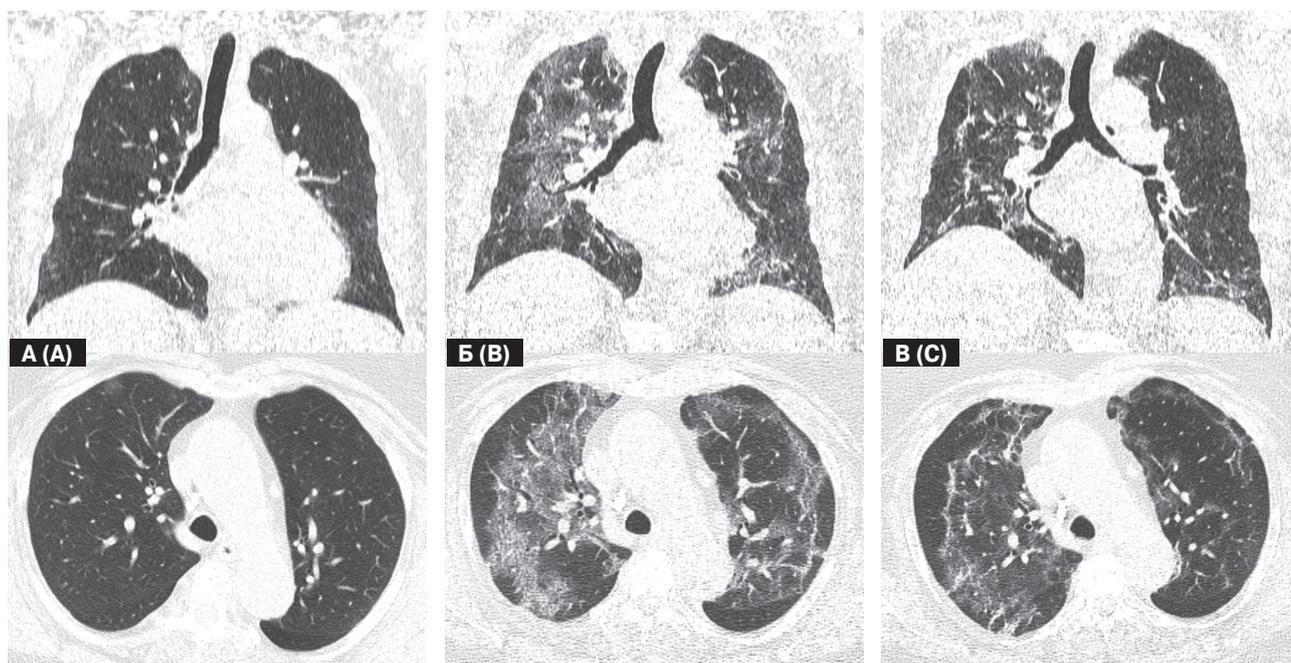
**Рисунок 2. Динамика СРБ при поступлении, через 7 дней и при выписке**

Figure 2. Dynamics of serum CRP level on admission, 7 days later and at discharge from hospital

в течение того же времени значимого снижения уровня СРБ не наблюдалось. Подробная характеристика динамики изменения концентрации СРБ указана в табл. 2.

На рис. 2 продемонстрирована скорость снижения уровня СРБ в первой группе. Полученные данные подтверждают положительное, противовоспалительное влияние сеансов ультрафиолетового облучения крови на течение заболевания. Также выявлено, что уровень снижения СРБ значительно больше в первой исследуемой группе ( $p < 0,001$ ).

Летальность в первой группе не зарегистрирована, что подтверждает безопасность УФОК для лиц с коронавирусной пневмонией. Во второй группе зарегистрирована летальность в 2,8% случаев. Основной причиной летальности стало тяжелое течение новой коронавирусной инфекции с поражением легких 3 степени по КТ и развитием тяжелой дыхательной недостаточности. На рис. 3 представлены компью-



**Рисунок 3. КТ органов грудной клетки у пациентки 63 лет с подтвержденным SARS-CoV-2**

Figure 3. Chest CT scan in a 63-year-old female patient with confirmed SARS-CoV-2

**Примечание.** А — первые сутки после госпитализации, объем пораженной паренхимы 15%,  $sPO_2 = 98\%$ ; Б — через 6 дней, участки инфильтративных изменений по типу «матового стекла» различной степени интенсивности неправильной формы с неровными нечеткими контурами, объем пораженной паренхимы до 70%,  $sPO_2 = 86\%$ , КТ-картина двусторонней пневмонии (КТ3). В — на контрольной СКТ ОГК через 16 дней положительная динамика после проведения сеансов УФОК в виде уменьшения интенсивности и площади воспалительных изменений, с обеих сторон, преобразование участков «матового стекла» в тяжистые уплотнения по типу консолидации и ретикулярные изменения, положительная динамика, объем поражения легких снизился до 30%.

Note. А — the first day after hospitalization, the volume of the affected parenchyma is 15%,  $sPO_2 = 98\%$ ; B — after 6 days, areas with ground-glass opacity infiltrative changes of varying intensity of irregular shape with uneven fuzzy contours, the volume of the affected parenchyma is up to 70%,  $sPO_2 = 86\%$ , CT scan of bilateral pneumonia (CT3). C — on the control CT of the chest 16 days after, positive dynamics after the UBI sessions in the form of a decrease in the intensity and area of inflammatory changes, on both sides, transformation of the ground-glass opacity areas into heavy seals of the consolidation type and reticular changes, positive dynamics, the volume of lung damage dropped to 30%.

терные томограммы пациента, лечение которого дополнялось процедурой УФОК. Временной промежуток между первичным и повторным КТ-исследованием составил 10 дней.

## Обсуждение

Метод ультрафиолетового облучения крови (УФОК) применяется в медицине уже более 80 лет [4]. Ультрафиолетовое облучение крови оказывает выраженное многокомпонентное, патогенетически обоснованное влияние при целом ряде патологических состояний. Во многих работах показано эффективное применение данного метода при ишемической болезни сердца, хронических заболеваниях кожи, периферических нейропатиях и ангиопатиях [1, 2]. Использование УФОК при внебольничной двусторонней полисегментарной вирусной пневмонии, вызванной новой коронавирусной инфекцией COVID-19, недостаточно изучено.

Проведение УФОК в первой группе пациентов показало достоверное снижение системной воспалительной реакции, что, вероятно, повлияло на процесс воспалительных изменений в сосудистой стенке, участвующих в развитии локального ДВС-синдрома. Согласно литературным данным, фотогемокоррекция влияла на улучшение кровотока у лиц, страдающих воспалительными заболеваниями сосудов (энтертериитом). У таких пациентов регистрируется увеличение просвета артерии за счет уменьшения воспаления ее стенки. Такое расширение просвета артерии у этих больных, по-видимому, было связано с устранением вазоконстрикции [3].

Полученные в ходе нашего исследования данные показали положительное влияние в виде снижения СРБ в течение 7 дней после начала курса УФОК с  $11,5 \pm 7,1$  до  $2,1 \pm 3,2$  ( $p < 0,001$ ). Купирование системной воспалительной реак-

ции положительно сказалось на сроках выписки, а данные КТ в динамике показали значительное уменьшение инфильтративных изменений в легочной ткани. Сопоставимые результаты купирования воспалительных явлений и более быстрого периода восстановления описываются при применении блокаторов цитокинового шторма, в частности препарата Тоцилизумаб [8, 10]. Использование УФОК метода позволило уменьшить время госпитализации пациентов, снизив средний срок пребывания в стационаре с 18 до 11 койко-дней. Подобное снижение количества койко-дней встречается и в ряде других исследований [4]. Таким образом, дополнение схемы терапии методом УФОК для пациентов с COVID-19 может значительно ускорить и улучшить результаты лечения.

Описанные позитивные результаты применения метода фотогемокоррекции могут способствовать включению метода УФОК в методические рекомендации по диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции.

## Заключение

1. Применение ультрафиолетового облучения крови является эффективным и безопасным дополнительным методом лечения больных с внебольничной полисегментарной двусторонней вирусной пневмонией, вызванной COVID-19.

2. УФОК позволяет сократить сроки лечения больных.

3. УФОК помогает добиться снижения уровня СРБ на 83% в течение 7 дней лечения по сравнению с контрольной группой.

## Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

## Список литературы/References

1. Байтяков В.В. Внутрисосудистое и экстракорпоральное ультрафиолетовое облучение крови в комплексной терапии распространенного псориаза // Казанский медицинский журнал. 2011. Т. 92, № 3. С. 398–401. [Baytyakov V.V. Intravascular and extracorporeal ultraviolet radiation of blood in complex therapy of generalized psoriasis. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2011, vol. 92, no. 3, pp. 398–401. (In Russ.)]
2. Бельюк С.Н., Снежицкий В.А. Возможность применения методов квантовой фототерапии (ультрафиолетовое и лазерное облучение крови) в кардиологии // Журнал ГрГМУ. 2011. № 1. С. 16–19. [Belyuk S.N., Snezhitskiy V.A. The possibility of using the methods of quantum phototherapy (ultraviolet and laser blood irradiation) in cardiology. *Zhurnal grodnenskogo gosudarstvennogo universiteta = Journal of Grodno State Medical University*, 2011, vol. 33, no. 1, pp. 16–19. (In Russ.)]
3. Карандашов В.И. Ультрафиолетовое облучение крови в лечении заболеваний сосудов нижних конечностей // Лазерная медицина. 2017. Т. 21, № 1. С. 4–11. [Karashev V.I. Ultraviolet irradiation of blood for the treatment of vascular diseases in lower extremities. *Lazernaya meditsina = Laser Medicine*, 2017, vol. 21, no. 1, pp. 4–11. (In Russ.)] doi: 10.37895/2071-8004-2017-21-1-4-11
4. Коплатадзе А.М., Носов В.А., Протсенко В.М., Кожин Д.Г., Болквядзе Э.Э., Егоркин М.А. Ультрафиолетовое облучение крови в комплексном лечении больных острым парапроктитом // Сибирский медицинский журнал. 2008. № 6. С. 94–96. [Koplatadze A.M., Nosov V.A., Protzenko V.M., Kozhin D.G., Bolkvadze E.E., Egorkin M.A. Ultra-violet irradiation of blood in complex treatment of patients with acute paraproctitis. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2008, no. 6, pp. 94–96. (In Russ.)]
5. Connors J.M., Levy J.H. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood*, 2020, vol. 23, no. 135, pp. 2033–2040. doi: 10.1182/blood.202000600

6. Le Berre A., Marteau V., Emmerich J., Zins M. Concomitant acute aortic thrombosis and pulmonary embolism complicating COVID-19 pneumonia. *Diagn. Interv. Imaging*, 2020, vol. 101, no. 5, pp. 321–322. doi: 10.1016/j.diii.2020.04.003
7. Levi M., Thachil J., Iba T., Levy J.H. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol.*, 2020, vol. 7, no. 6, pp. 438–440. doi: 10.1016/S2352-3026(20)30145-9
8. Luo P., Liu Y., Qiu L., Liu X., Liu D., Li J. Tocilizumab treatment in COVID-19: a single center experience. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 7, pp. 814–818. doi: 10.1002/jmv.25801
9. Wong J.P., Viswanathan S., Wang M., Sun L.Q., Clark G.C., D’Elia R.V. Current and future developments in the treatment of virus-induced hypercytokinemia. *Future Med. Chem.*, 2017, vol. 9, no. 2, pp. 169–178. doi: 10.4155/fmc-2016-0181
10. Zhang C., Wu Z., Li J.W., Zhao H., Wang G.Q. Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2020, vol. 55, no. 5: 105954. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105954

**Авторы:**

**Ходза И.Э.**, зав. отделением гравитационной хирургии крови СПб ГБУЗ Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия;

**Пуздряк П.Д.**, врач сердечно-сосудистой хирургии по оказанию экстренной помощи отделения сосудистой хирургии СПб ГБУЗ Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия; аспирант кафедры общей хирургии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

**Бондаренко П.Б.**, врач сердечно-сосудистой хирургии по оказанию экстренной помощи отделения сосудистой хирургии СПб ГБУЗ Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия;

**Дегтярев А.М.**, врач отделения гравитационной хирургии крови СПб ГБУЗ Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия;

**Ерофеев А.А.**, к.м.н., зам. главного врача по хирургии СПб ГБУЗ Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия;

**Чижова К.А.**, студентка 5 курса ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

**Шломин В.В.**, к.м.н., зав. отделением сосудистой хирургии СПб ГБУЗ Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия;

**Ведерникова Е.С.**, врач-кардиолог отделения сосудистой хирургии СПб ГБУЗ Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Khodza I.E.**, Head of the Department of Gravitational Blood Surgery, City Multiservice Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation;

**Puzdryak P.D.**, Cardiovascular Surgeon for Emergency Care, Department of Vascular Surgery, City Multiservice Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation; Postgraduate Student, Department of General Surgery, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Bondarenko P.B.**, Cardiovascular Surgeon for Emergency Care, Department of Vascular Surgery, City Multiservice Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation;

**Degtyarev A.M.**, Doctor, Department of Gravitational Surgery of Blood, City Multiservice Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation;

**Erofeev A.A.**, PhD (Medicine), Deputy Head Surgeon, City Multiservice Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation;

**Chizhova K.A.**, 5<sup>th</sup> year Student, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Shlomin V.V.**, PhD (Medicine), Head of the Department of Vascular Surgery, City Multiservice Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation;

**Vedernikova E.S.**, Cardiologist, Department of Vascular Surgery, City Multiservice Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation.

# ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПРОТИВОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА, ВЫДЕЛЕННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ КАЗАХСТАНА В 2018–2019 гг.

Т.И. Глебова, Н.Г. Кливлеева, Г.В. Лукманова, Н.Т. Сактаганов,  
А.М. Баймухаметова

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан

**Резюме.** Грипп представляет серьезную проблему для общественного здравоохранения. Для практической медицины и вирусологии самой серьезной проблемой является способность возбудителя гриппа к модификации в процессе репликации, что может приводить к кардинальному изменению таких свойств вируса, как инфекционность и вирулентность. Высокая мутационная изменчивость вирусов гриппа может способствовать быстрому приобретению устойчивости к лекарственным препаратам. Поэтому изучение чувствительности вирусов гриппа к противовирусным препаратам необходимо для обоснования надлежащего применения лекарственных средств для терапии и профилактики гриппозной инфекции. Цель данного исследования — изучение чувствительности казахстанских штаммов вирусов гриппа А/Н1N1 и В, выделенных в различных регионах Казахстана в 2018–2019 гг., к противовирусным препаратам. *Материалы и методы.* Анализ чувствительности 20 штаммов вируса гриппа А/Н1N1 и В проводили со следующими химиопрепаратами: Ремантадин, Тамифлю, Арбидол и Ингавирин. Вирусы культивировали в аллантоисной полости развивающихся 10-дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч при 36°C. Гемагглютинирующую активность определяли по общепринятой методике на 96-луночных планшетах с использованием 0,75% взвеси куриных эритроцитов, инфекционность вычисляли по методу Reed L. и Muench H. Чувствительность штаммов вируса к различным концентрациям противовирусных препаратов оценивали по степени подавления репродукции 100 Ig ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл вируса на куриных эмбрионах. Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010. *Результаты.* Изучение чувствительности к химиопрепаратам показало гетерогенность популяции казахстанских вирусов гриппа А и В 2018–2019 гг. по этому признаку. Чувствительность к препарату Тамифлю обнаружена у всех казахстанских штаммов вируса гриппа А/Н1N1 и трех штаммов вируса гриппа В (ингибирующая концентрация составляла 0,44–25,38 мкг/мл). Репродукция большинства вирусов эффективно ингибировалась препаратом Тамифлю в концентрации 0,68–3,23 мкг/мл. Для трех штаммов вируса А/Н1N1 ингибирующая концентрация составила 7,23–25,38 мкг/мл. Ремантадин подавлял репродукцию вирусов в более высоких дозах (12,60–25,55 мкг/мл). К Арбидолу и Ингавирину все

**Адрес для переписки:**

Глебова Татьяна Ивановна  
050010, Казахстан, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 105,  
ТОО «Научно-производственный центр микробиологии  
и вирусологии».  
Тел.: 8 (727) 291-84-97. Факс: 8 (727) 291-84-96.  
E-mail: biochem\_vir@mail.ru, taty1962@mail.ru

**Contacts:**

Tatyana I. Glebova  
050010, Kazakhstan, Almaty, Bogenbay batyr str., 105, Research  
and Production Center for Microbiology and Virology.  
Phone: +7 (727) 291-84-97. Fax: +7 (727) 291-84-96.  
E-mail: biochem\_vir@mail.ru, taty1962@mail.ru

**Для цитирования:**

Глебова Т.И., Кливлеева Н.Г., Лукманова Г.В., Сактаганов Н.Т.,  
Баймухаметова А.М. Чувствительность к противовирусным препаратам  
штаммов вируса гриппа, выделенных в различных регионах Казахстана  
в 2018–2019 гг. // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1159–1166.  
doi: 10.15789/2220-7619-FOE-1596

**Citation:**

Glebova T.I., Klivleyeva N.G., Lukmanova G.V., Saktaganov N.T.,  
Baimukhametova A.M. 2018–2019 antiviral drug sensitivity of the influenza  
virus strains isolated from various regions of Kazakhstan // Russian Journal  
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6,  
pp. 1159–1166. doi: 10.15789/2220-7619-FOE-1596

Работа выполнена в рамках научно-технической программы комитета науки Министерства науки и образования Республики Казахстан № BR10965178  
«Разработка оригинальных отечественных препаратов с противовирусной активностью, эффективных в отношении COVID-19 и гриппа»

The work was carried out under the scientific and technical program of the Committee of Science of the Ministry of Science and Education of the Republic of Kazakhstan  
No. BR10965178 "Development of original domestic drugs with antiviral activity efficient against COVID-19 and influenza".

исследованные вирусы оказались резистентными. Один штамм вируса гриппа типа В оказался слабо чувствительным к Ингавируну. *Выводы.* Гетерогенность популяции вирусов гриппа по чувствительности к противовирусным препаратам указывает на необходимость постоянного эпидемиологического надзора для выявления лекарственно-устойчивых вариантов.

*Ключевые слова:* вирус гриппа, резистентность, чувствительность, Арбидол, Ингавирин, Ремантадин, Тамифлю.

## 2018–2019 ANTIVIRAL DRUG SENSITIVITY OF THE INFLUENZA VIRUS STRAINS ISOLATED FROM VARIOUS REGIONS OF KAZAKHSTAN

Glebova T.I., Klivleyeva N.G., Lukmanova G.V., Saktaganov N.T., Baimukhametova A.M.

Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

**Abstract.** Influenza is a serious public health problem. The ability of influenza virus to change upon replication is the most serious issue for practical medicine and virology, which can fundamentally alter virus biological properties, such as infectivity and virulence. The high mutational variability of influenza viruses can contribute to rapidly emerging drug resistance. Therefore, the study of antiviral drug sensitivity among influenza viruses is necessary to justify proper drug use for treatment and prevention of influenza infection. The aim of the study was to examine antiviral drug susceptibility of influenza A/H1N1 and B virus strains isolated from various regions of Kazakhstan in the years 2018–2019. *Materials and methods.* The susceptibility analysis of 20 strains of influenza A/H1N1 and B viruses was carried out by using chemotherapeutic agents including Remantadine, Tamiflu, Arbidol, and Ingavirin. Viruses were cultured in the allantoic cavity of developing 10-day-old chicken embryos for 48 hours at 36°C. The hemagglutinating activity was determined according to the standard method on 96-well plates using 0.75% chicken red blood cell suspension; the infectivity was calculated by the Reed–Muench method. The susceptibility of virus strains to different concentrations of antiviral drugs was evaluated by the level of virus reproductive suppression of 100 lg EID<sub>50</sub>/0.2 ml in chicken embryos. Statistical analysis was performed using Microsoft Office Excel 2010 software. *Results.* A study of susceptibility to chemotherapeutic agents demonstrated heterogeneity of influenza A and B virus population isolated in Kazakhstan during the 2018–2019 period. The susceptibility to tamiflu was found in all Kazakhstan strains of influenza A/H1N1 virus and three type B strains (inhibitory concentration was 0.44–25.38 µg/mL). The reproduction of most viruses was effectively inhibited by Tamiflu at a concentration of 0.68–3.23 µg/mL. The inhibitory concentration for three strains of A/H1N1 virus was 7.23–25.38 µg/mL. Remantadine inhibited reproduction of viruses at higher doses (12.60–25.55 µg/mL). All investigated viruses were resistant to Arbidol and Ingavirin. A single type B influenza virus strain was found to be weakly susceptible to Ingavirin. *Conclusion.* The heterogeneity of influenza virus population in susceptibility to antiviral drugs suggest a need for constant epidemiological surveillance in order to identify drug-resistant variants.

*Key words:* influenza virus, resistance, sensitivity, Arbidol, Ingavirin, Remantadine, Tamiflu.

## Введение

Грипп представляет серьезную проблему для общественного здравоохранения. Вызывая ежегодные сезонные эпидемии и периодические пандемии, гриппозная инфекция приводит к развитию различных осложнений, основным из которых является вторичная бактериальная пневмония, нередко со смертельным исходом в группах риска. Ежегодно, по данным ВОЗ, регистрируются десятки миллионов случаев заболевания гриппом, из которых около полу-миллиона заканчиваются летально [1].

Для практической медицины и вирусологии в плане создания вакцинных, диагностических и лечебных препаратов самой серьезной проблемой является способность возбудителя гриппа постоянно изменяться в процессе репликации. Сегментированная структура генома вируса гриппа способствует реассортации генов, зачастую приводящей к кардинальному изменению биологических свойств, таких как инфекционность и вирулентность [11, 21,

28]. Одной из важнейших характеристик вируса является его чувствительность к специфическим лекарственным средствам. Однако высокая мутационная изменчивость вирусов гриппа может способствовать быстрому приобретению устойчивости к лекарственным препаратам [4, 6, 20]. Именно поэтому изучение чувствительности вирусов гриппа к противовирусным препаратам необходимо для обоснования надлежащего применения лекарственных средств для терапии и профилактики гриппозной инфекции [2].

Химиотерапия вирусных инфекций возникла в конце 1960 гг. — начале 1970 гг., когда были установлены противовирусные свойства производных адамантана. К настоящему времени накоплен значительный опыт применения химиопрепаратов, разрабатываются принципиально новые средства лечения и профилактики гриппа и ОРВИ [4]. Эффективная стратегия по борьбе с гриппом предполагает применение этиотропных средств, оказывающих непосредственное воздействие на специфическую ми-

шень — вирусный белок, участвующий в цикле репликации. Наиболее широко применяемые в Казахстане лекарственные противогриппозные средства представлены четырьмя группами этиотропных препаратов [4]:

- блокаторы ионного канала (адамантаны, в том числе Ремантадин);
- ингибиторы нейраминидазы (Тамифлю (осельтамивир), Реленза, Перамивир);
- специфический шаперон гемагглютини-на (Арбидол);
- ингибиторы NP-белка (Ингавирин).

Целью настоящей работы было изучение чувствительности казахстанских штаммов вирусов гриппа А/Н1N1 и В, выделенных в различных регионах Казахстана в 2018–2019 гг., к противовирусным препаратам.

## Материалы и методы

**Вирусы.** Для исследований использовали 17 штаммов вируса гриппа А/Н1N1 и три штамма вируса гриппа В, выделенные в различных регионах Казахстана в 2018–2019 гг., а также референсные штаммы А/swine/Iowa/15/30, А/swine/USA/1976/31, А/New Jersey/8/76, А/Solomon Islands/03/06, А/California/04/09pdm и В/Shandong/07/97, хранящиеся в коллекции лаборатории биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии».

**Противовирусные препараты.** В экспериментах использовали следующие лекарственные средства:

- Ремантадин (100 мг/капсула, Olainfarm, Латвия);
- Тамифлю (75 мг/капсула, Cenexi SAS, Франция, упаковано F. Hoffmann–La Roche AG, Швейцария);
- Арбидол (100 мг/капсула умифеновира гидрохлорида моногидрата в пересчете на умифеновира гидрохлорид, ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия);
- Ингавирин (90 мг/капсула имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты – витаглутам, ОАО «Валента Фармацевтика», Россия).

Вирусы культивировали в аллантоисной полости развивающихся 10-дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч при 36°C. Гемагглютинирующую активность определяли по общепринятой методике на 96-луночных планшетах с использованием 0,75% взвеси куриных эритроцитов [26]. Инфекционность вычисляли по методу Reed L. и Muench H. [25].

Чувствительность выделенных штаммов к различным концентрациям противовирусных препаратов оценивали по степени подавления репродукции 100 ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл вируса на куриных эмбрионах. Препараты, растворенные в фосфатном буферном растворе в concentra-

ции 50 мг/мл, использовали в качестве исходных. Дозу препарата, подавляющую титр вируса в реакции гемагглютинации в 2 раза по сравнению с контролем, считали ингибирующей концентрацией (ИК<sub>50</sub>) [14]. Для каждой комбинации концентраций препарата и вирусного материала проводили три независимых эксперимента.

**Статистический анализ.** При статистической обработке для всех серий результатов находили средние геометрические (geometric mean titer, GMT) и определяли их стандартные отклонения ( $\pm$ SD) [3] с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010.

## Результаты

Результаты изучения чувствительности казахстанских вирусов гриппа к химиопрепаратам в сравнении с референсными штаммами представлены в таблице. Установлена гетерогенность популяции казахстанских вирусов гриппа А и В 2018–2019 гг. по этому признаку. Так или иначе все штаммы вирусов гриппа показали чувствительность к Тамифлю, репродукция всех изолятов ингибировалась в дозах от 0,44 $\pm$ 0,44 до 25,38 $\pm$ 1,5 мкг/мл. Большая часть вирусов гриппа А и В (А/Алматы/04/18, А/Алматы/05/18, А/Караганда/14/18, А/Павлодар/20/18, А/Алматы/01/19, А/Алматы/04/19, А/Алматы/05/19, А/Павлодар/09/19, А/Павлодар/11/19, А/СКО/13/19, А/Караганда/23/19, А/Караганда/24/19, А/ВКО/39/19, А/ЗКО/41/19 В/Алматы/06/18, В/Алматы/07/18, В/Алматы/08/18) эффективно ингибировались препаратом Тамифлю (ИК<sub>50</sub> = от 0,68 до 3,23 мкг/мл), причем штамм В/Алматы/08/18 проявил чувствительность исключительно к этому препарату. По данному признаку упомянутые изоляты сходны с референсными вариантами А/Solomon Islands/03/06 и В/Shandong/07/97, которые также более чувствительны к Тамифлю (ИК<sub>50</sub> = 3,40 и 9,31 мкг/мл соответственно). Менее чувствительными к Тамифлю были вирусы А/Атырау/17/18, А/Атырау/18/18 и А/Павлодар/19/18 (ИК<sub>50</sub> = от 7,23 до 25,38 мкг/мл).

В более высоких дозах подавлялись Ремантадином вирусы А/Алматы/04/18, А/Алматы/05/18, А/Павлодар/19/18, А/Павлодар/20/18, А/Алматы/05/19, А/Павлодар/09/19, А/Павлодар/11/19, А/СКО/13/19, А/ВКО/39/19, А/ЗКО/41/19, В/Алматы/06/18 и В/Алматы/07/18. ИК<sub>50</sub> Ремантадина для данных вирусов составила 12,60–25,55 мкг/мл. Штамм В/Алматы/08/18, аналогично эталону А/California/04/09, оказался резистентным к данному препарату. Три изолята (А/Атырау/17/18, А/Атырау/18/18 и А/Караганда/14/18), напротив, проявили большую чувствительность по отношению к Ремантадину (ИК<sub>50</sub> = 3,90, 3,49 и 13,23 мкг/мл), чем

**Таблица. Чувствительность казахстанских и референсных штаммов вирусов гриппа к химиопрепаратам (GMT±SD)**

Table. Sensitivity of Kazakhstan and reference influenza virus strains to chemotherapeutic agents (GMT±SD)

Вирус Virus	Ингибирующая концентрация препарата, мкг/мл Inhibitory concentration, µg/ml			
	Тамифлю Tamiflu	Ремантадин Remantadine	Арбидол Arbidol	Ингавирин Ingavirin
<b>Казахстанские штаммы</b> Kazakhstan strains				
<b>А/Алматы/04/18 (H1N1)</b> A/Almaty/04/18 (H1N1)	3,23±0,6	12,60±0,6	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/Алматы/05/18 (H1N1)</b> A/Almaty/05/18 (H1N1)	1,38±0,9	12,88±0,8	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/Караганда/14/18 (H1N1)</b> A/Karaganda/14/18 (H1N1)	1,90±0,6	3,94±1,0	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/Атырау/17/18 (H1N1)</b> A/Atyrau/17/18 (H1N1)	7,23±0,5	3,90±0,3	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/Атырау/18/18 (H1N1)</b> A/Atyrau/18/18 (H1N1)	12,98±0,5	3,49±0,3	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/Павлодар/19/18 (H1N1)</b> A/Pavlodar/19/18 (H1N1)	25,38±1,5	13,23±2,8	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/Павлодар/20/18 (H1N1)</b> A/Pavlodar/20/18 (H1N1)	0,70±1,0	25,50±3,0	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/Алматы/01/19 (H1N1)</b> A/Almaty/01/19 (H1N1)	0,67±0,13	50,22±0,03	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/Алматы/04/19 (H1N1)</b> A/Almaty/04/19 (H1N1)	3,11±0,40	42,01±8,13	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/Алматы/05/19 (H1N1)</b> A/Almaty/05/19 (H1N1)	1,84±0,21	25,42±0,08	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/Павлодар/09/19 (H1N1)</b> A/Pavlodar/09/19 (H1N1)	0,44±0,44	25,08±0,6	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/Павлодар/11/19 (H1N1)</b> A/Pavlodar/11/19 (H1N1)	0,98±0,9	25,50±0,6	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/СКО/13/19 (H1N1)</b> A/SKO/13/19 (H1N1)	0,62±0,06	25,55±0,11	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/Караганда/23/19 (H1N1)</b> A/Karaganda/23/19 (H1N1)	1,15±0,09	50,17±0,07	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/Караганда/24/19 (H1N1)</b> A/Karaganda/24/19 (H1N1)	1,92±0,07	50,26±0,03	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/ВКО/39/19 (H1N1)</b> A/VKO/39/19(H1N1)	0,97±0,05	25,52±0,11	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>А/ЗКО/41/19 (H1N1)</b> A/ZKO/41/19 (H1N1)	1,28±0,12	25,42±0,08	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>В/Алматы/06/18</b> B/Almaty/06/18	0,68±1,0	15,13±1,7	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	25,50±0,6
<b>В/Алматы/07/18</b> B/Almaty/07/18	2,04±1,1	25,38±1,0	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>В/Алматы/08/18</b> B/Almaty/08/18	1,22±1,2	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit

Вирус Virus	Ингибирующая концентрация препарата, мкг/мл Inhibitory concentration, µg/ml			
	Тамифлю Tamiflu	Ремантадин Remantadine	Арбидол Arbidol	Ингавирин Ingavirin
<b>Референсные штаммы</b> Reference strains				
<b>A/swine/Iowa/15/30 (Hsw1N1)</b>	6,51±0,1	6,75±0,2	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>A/swine/USA/1976/31(Hsw1N1)</b>	6,60±0,6	7,05±0,1	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>A/New Jersey/8/76 (H1N1)</b>	6,25±0,1	12,65±0,2	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>A/California/04/09 (H1N1) pdm</b>	3,50±0,02	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>A/Solomon Islands/03/06 (H1N1)</b>	3,40±0,02	6,4±0,02	<b>не ингибирует</b> does not inhibit	<b>не ингибирует</b> does not inhibit
<b>B/Shandong/07/97</b>	9,31±1,3	18,01±1,2	25,85±1,5	<b>не ингибирует</b> does not inhibit

**Примечание.** Указана концентрация препарата, вызывающая снижение репродукции вируса в развивающихся куриных эмбрионах в два раза.  
Note. Drug concentration causing 2-fold reduced virus reproduction in chicken embryos is indicated.

к Тамифлю ( $ИК_{50} = 12,98, 7,23$  и  $25,08$  мкг/мл соответственно). Вирус А/Караганда/14/18 оказался чувствительным и к Тамифлю ( $ИК_{50} = 1,90$  мкг/мл), и к Ремантадину ( $ИК_{50} = 3,94$  мкг/мл) аналогично эталонным вирусам (А/swine/Iowa/15/30, А/swine/USA/1976/31 и А/Solomon Islands/03/06).

К Арбидолу все исследованные вирусы оказались резистентными. К Ингавирину лишь один вирус (В/Алматы/06/18) оказался слабо чувствительным ( $ИК_{50} = 25,50$  мкг/мл).

Таким образом, при изучении чувствительности по отношению к этиотропным химиопрепаратам вирусов, циркулировавших в 2018–2019 гг., установлена гетерогенность популяции казахстанских штаммов среди вирусов гриппа А/Н1N1 и В.

## Обсуждение

Амантадин и Ремантадин ( $\alpha$ -метил-1-адамантанметиламин) являются препаратами строго направленного действия на вирусоспецифическую мишень, локализованную в трансмембранной области минорного поверхностного белка М2 вирусов гриппа типа А. Они необратимо ингибируют М2-белок и тем самым останавливают поток протонов через мембраны вирионов. Препараты адамантана, блокируя функции ионных каналов, нарушают процесс «раздевания» вируса [8, 22]. Ремантадин можно отнести к категории выдающихся препаратов. Открытый практически случайно, препарат оставался основным для лечения гриппа в те-

чение более 35 лет. Однако начиная с 1980 гг. эффективность его применения постепенно снижалась из-за появления резистентных форм вирусов [4, 12]. В литературе представлены данные многочисленных исследований, свидетельствующие о резистентности вариантов пандемического штамма А/Н1N1/2009 к препаратам адамантанового ряда [13, 19]. Результаты изучения чувствительности казахстанских штаммов по отношению к Ремантадину показали, что большее число вирусов, подобно эталонному штамму А/California/04/09pdm, проявили резистентность к данному препарату. В отличие от них штаммы А/Караганда/14/18, А/Атырау/17/18 и А/Атырау/18/18 оказались чувствительными к данному препарату.

Ингибиторы нейраминидазы вируса гриппа А и В (Реленза, Тамифлю, Осельтамивир) для лечения гриппа применяются с 1999 г., когда была показана более чем 80%-ная эффективность препаратов [5, 13]. Нейраминидаза — фермент, контролирующий процессы почкования и высвобождения зрелых вирусных частиц от мембран инфицированных клеток путем отщепления остатков сиаловых кислот от олигосахаридов гемагглютинина. Кроме этого, нейраминидаза играет определенную роль в начальных стадиях проникновения вирусов гриппа в клетки, то есть в их инфицировании. Ингибиторы нейраминидазы взаимодействуют с активным центром фермента и являются конкурентными ингибиторами, нарушая процессы проникновения вирусов в клетку и почкования зрелых вирионов от мембран инфицированных клеток. Применение

Осельтамивира приводит к сокращению средней продолжительности заболевания на 37%, уменьшает проявление симптомов заболевания на 30–38% и на 67% снижает частоту вторичных осложнений гриппа. Препарат хорошо переносится больными и на 71% снижает смертность от осложнений у пожилых людей, относящихся к группе повышенного риска [4, 8]. В связи с этим ингибиторы нейраминидазы, в особенности Тамифлю, широко используются при лечении гриппа. Однако в последнее время появляются сведения о приобретении вирусами гриппа устойчивости к данному препарату [24, 27].

В проведенных исследованиях все штаммы вирусов гриппа А/Н1N1 и В, как референсные, так и казахстанские, показали чувствительность к Тамифлю. Препарат эффективно в низких значениях ИК<sub>50</sub> подавлял репродукцию на куриных эмбрионах почти всех вирусов, взятых в эксперимент, за исключением трех штаммов: А/Атырау/17/18, А/Атырау/18/18 и А/Павлодар/19/18, которые можно охарактеризовать как среднечувствительные по отношению к данному препарату.

Помимо препаратов прямого противовирусного действия, в России с той же целью используются вещества, обладающие комбинированным механизмом активности [17]. Одним из эффективных российских противовирусных препаратов для лечения гриппа и других ОРВИ считается Арбидол (Умифеновир) [4]. В литературе встречаются упоминания об эффективности Арбидола по отношению к вирусам гриппа и отсутствию резистентных к нему штаммов [7]. Препарат действует на ранних стадиях репродукции вируса. Механизм действия Арбидола заключается в индукции конформационных изменений поверхностного белка гемагглютинаина, ведущих к нарушению слияния вирусной липидной оболочки с мембранами эндосом, необходимое для высвобождения вирусного нуклеокапсида и начала транскрипции вирусного генома [16]. Другой препарат этого класса —

Ингавирин — является ингибитором олигомеризации белка NP вирусов гриппа [9, 17]. Однако есть мнение, что его терапевтическая эффективность обусловлена не прямым вирус-специфическим действием, а иными фармакологическими эффектами. В частности, Ингавирин обладает выраженным противовоспалительным действием [4]. Вопреки имеющимся данным об эффективности применения Арбидола и Ингавирина для лечения гриппа, в своем исследовании нам не удалось выявить их ингибирующего действия в отношении казахстанских вирусов гриппа, взятых в эксперимент.

В последнее время появляются литературные данные об изоляции резистентных штаммов из проб, полученных у пациентов, которые ранее не принимали специфические противовирусные средства, что можно объяснить передачей таких штаммов от человека к человеку [14]. Устойчивость вирусов гриппа к противовирусным препаратам обусловлена мутациями в том вирусном белке, который является мишенью для действия препарата [10, 23] и развивается при многократном его использовании [4, 18].

## Выводы

При изучении чувствительности казахстанских штаммов вируса гриппа А/Н1N1 и В, циркулировавших в 2018–2019 гг., к противовирусным препаратам установлена гетерогенность популяции по этому признаку. В отношении коммерческого противогриппозного препарата Тамифлю все штаммы проявили чувствительность. Резистентность к Ремантадину выявлена у большего числа казахстанских вирусов (кроме А/Караганда/14/18, А/Атырау/17/18 и А/Атырау/18/18), к Арбидолу и Ингавирину — у всех вирусов.

Полученные результаты указывают на необходимость выявления лекарственно-устойчивых вариантов вирусов гриппа, что требует проведения постоянного эпидемиологического надзора.

## Список литературы/References

- ВОЗ. Грипп [WHO. Influenza (*In Russ.*)] URL: [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
- ВОЗ. Грипп. Стандарты эпиднадзора за управляемыми инфекциями. [WHO. Influenza. Managed Infections Surveillance Standards. (*In Russ.*)] URL: [http://www.who.int/influenza/resources/documents/influenza\\_surveillance\\_manual/en](http://www.who.int/influenza/resources/documents/influenza_surveillance_manual/en)
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. Ю.А. Данилова. М.: Практика, 1998. 459 с. [Glantz S. Biomedical statistics. Translated by Yu.A. Danilov. Moscow: Practice, 1998. 459 p. (*In Russ.*)]
- Грипп А/Н1N1 как типичная эмерджентная инфекция. Под ред. О.И. Киселева, В.П. Малого, В.В. Зарубаева. [Influenza A/H1N1 as a typical emergent infection. Ed. by O.I. Kiselev, V.P. Malyi, V.V. Zarubaev. (*In Russ.*)] URL: <http://www.infomedik.info/med/a21022601.htm>
- Грипп: эпидемиология, клиника, профилактика. Грипп — взгляд вирусолога и лечащего врача. Под ред. О.И. Киселева, Л.М. Цыбаловой, В.И. Покровского. М.: МИА, 2012. 496 с. [Influenza: epidemiology, diagnosis, treatment, prevention. Ed. by O.I. Kiselev, L.M. Tsybalova, V.I. Pokrovsky. Moscow: Medical Information Agency, 2012. 496 p. (*In Russ.*)]
- Деева Э.Г., Мельникова Т.И. Антивирусные препараты для профилактики и лечения гриппа // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2009. № 4. С. 37–43. [Deeva E.G., Melnikova T.I. Antiviral drugs for the prevention and treatment of influenza. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2009, no. 4, pp. 37–43. (*In Russ.*)]

7. Деева Э.Г., Мельникова Т.И., Сологуб Т.В., Киселев О.И. Химиопрепараты для лечения гриппа — современное состояние // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2013. № 5. С. 26–32. [Deeva E.G., Melnikova T.I., Sologub T.V., Kiselev O.I. Antiviral drugs for influenza treatment — current status. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2013, no. 5, pp. 26–32. (In Russ.)]
8. Еропкин М.Ю., Брюзжикова Т.С., Гудкова Т.М., Коновалова Н.И., Смирнова М.Ю., Соловский М.В. Синтез и биологическая активность водорастворимых полимерных комплексов Арбидола // Химико-фармацевтический журнал. 2009. Т. 43, № 10. С. 37–31. [Eropkin M.Yu., Bryazhnikova T.S., Gudkova T.M., Konovalova N.I., Solovskii M.V., Smirnova M.Yu. Synthesis and biological activity of water-soluble polymer complexes of arbidol. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Chemical and Pharmaceutical Journal*, 2009, vol. 43, no. 10, pp. 37–31. (In Russ.)]
9. Железникова Г.Ф., Иванова В.В., Монахова Н.Е. Варианты иммунопатогенеза острых инфекций у детей. СПб.: Фолиант, 2007. 256 с. [Zheleznikova G.F., Ivanova V.V., Monakhova N.E. Variants of immunopathogenesis of acute infections in children. *St. Petersburg: Foliant*, 2007. 256 p. (In Russ.)]
10. Зарубаев В.В., Анфимов П.М., Штро А.А., Гаршинина А.В., Мелешкина И.А., Карпинская Л.А., Козелецкая К.Н., Киселев О.И. Разработка новых препаратов против вируса гриппа на основе синтетических и природных соединений // Вопросы вирусологии. 2012. Т. 57, № 6. С. 30–36. [Zarubaev V.V., Anfimov P.M., Shtro A.A., Garshinina A.V., Meleshkina I.A., Karpinskaya L.A., Kozeletskaya K.N., Kiselev O.I. Development of novel drugs against influenza virus based on synthetic and natural compounds. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2012, vol. 57, no. 6, pp. 30–36. (In Russ.)]
11. Киселев О.И., Малеев В.В., Деева Э.Г., Ленева И.А., Селькова Е.П., Осипова Е.А., Обухов А.А., Надоров С.А., Куликова Е.В. Клиническая эффективность препарата Арбидол (умифеновир) в терапии гриппа у взрослых: промежуточные результаты многоцентрового двойного слепого рандомизированного плацебо контролируемого исследования АРБИТР // Терапевтический архив. 2015. № 1. С. 88–96. [Kiselev O.I., Maleev V.V., Deeva E.G., Leneva I.A., Selkova E.P., Osipova E.A., Obukhov A.A., Nadorov S.A., Kulikova E.V. Clinical efficacy of Arbidol (umifenovir) in the therapy of influenza in adults: preliminary results of the multicenter double-blind randomized placebo-controlled study ARBITR. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2015, no. 1, pp. 88–96. (In Russ.)] doi: 10.17116/terarkh201587188-96
12. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Максимов В.А., Бондарев В.П., Небольсин В.Е. Изучение лечебной эффективности нового отечественного препарата Ингавирин® в отношении возбудителя гриппа А (H3N2) // Антибиотики и химиотерапия. 2008. Т. 53, № 7–8. С. 27–30. [Loginova S.Ya., Borisevich S.V., Maksimov V.A., Bondarev V.P., Nebolsin V.E. Therapeutic efficacy of Ingavirin®, a new russian formulation against influenza A virus (H3N2). *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2008, vol. 53, no. 7–8, pp. 27–30. (In Russ.)]
13. Романовская А.А., Дурьманов А.М., Шаршов К.А., Зайковская А.В., Сулопаров И.М., Шестопалов А.М., Ленева И.А., Дроздов И.Г. Изучение чувствительности вирусов гриппа А (H1N1), вызвавших заболевания в апреле–мае 2009 года, к противовирусным препаратам в культуре клеток МДСК // Антибиотики и химиотерапия. 2009. Т. 54, № 5–6. С. 41–47. [Romanovskaya A.A., Durymanov A.M., Sharshov K.A., Zaikovskaya A.V., Susloparov I.M., Shestopalov A.M., Leneva I.A., Drozdov I.G. Investigation of susceptibility of influenza viruses A (H1N1), the cause of infection in humans in april–may 2009, to antivirals in MDCK cell culture. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2009, vol. 54, no. 5–6, pp. 41–47. (In Russ.)]
14. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М.: ОАО «Издательство “Медицина”», 2005. 832 с. [Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Ed. by R.U. Khabriev. *Moscow: Medicine Publishing House*, 2005. 832 p. (In Russ.)]
15. Соболев И.А., Романовская А.А., Курская О.Г., Дурьманов А.Г., Шестопалов А.М., Ильичева Т.Н. Чувствительность вирусов гриппа А (сезон 2008–2009 гг.) к противовирусным препаратам // Вестник НГУ. Серия «Биология, клиническая медицина». 2011. Т. 9, № 3. С. 13–19. [Sobolev I.A., Romanovskaya A.A., Kurskaya O.G., Durymanov A.G., Shestopalov A.M., Ilyicheva T.N. The sensitivity of influenza viruses (season 2008–2009) to antiviral drugs. *Vestnik NGU. Seriya “Biologiya, klinicheskaya medicina” = Bulletin of NSU. “Biology, Clinical Medicine” Series*, 2011, vol. 9, no. 3, pp. 13–19. (In Russ.)]
16. Федякина И.Т., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Ленева И.А., Гудова Н.В., Кондратьева Т.В., Львов Д.К. Изучение чувствительности пандемических вирусов гриппа А 2009 H1N1 и высоковирулентных вирусов гриппа птиц А (H5N1) к противогриппозным химиопрепаратам // Антибиотики и химиотерапия. 2011. Т. 56, № 3–4. С. 3–9. [Fedyakina I.T., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Leneva I.A., Gudova N.V., Kondratieva T.V., Lvov D.K. Susceptibility of pandemic influenza virus A 2009 H1N1 and highly pathogenic avian influenza virus A H5N1 to anti-influenza agents in cell culture. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2011, vol. 56, no. 3–4, pp. 3–9. (In Russ.)]
17. Шмелева Н.П., Грибкова Н.В., Яцышина С.Б., Миненко А.Н. Чувствительность к ремантадину и озелтамивиру вирусов гриппа А, изолированных на территории Республики Беларусь // Военная медицина. 2008. № 4. С. 95–98. [Shmeleva N.P., Gribkova N.V., Yatsyshina S.B., Minenko A.N. Sensitivity to remantadine and oseltamivir of influenza A viruses isolated on the territory of the Republic of Belarus. *Voennaya meditsina = Military Medicine*, 2008, no. 4, pp. 95–98. (In Russ.)]
18. Beigel J., Bray M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antivir. Res.*, 2008, no. 78, pp. 91–102. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.01.003
19. Choi W., Yang I., Kim S., Lee N., Kwon M., Lee J., Kang C. The Emergence of oseltamivir-resistant seasonal influenza A (H1N1) virus in Korea during the 2008–2009 season. *Osong Public Health Res. Perspect.*, 2011, vol. 2, no 3, pp. 178–185. doi: 10.1016/j.phrp.2011.11.042
20. De Clercq E. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006, vol. 5, no. 12, pp. 1015–1025. doi: 10.1038/nrd2175
21. Gregory V., Bennett M., Orkhan M.H., Al Hajjar S., Varsano N., Mendelson E., Zambon M., Ellis J., Hay A., Lin Y.P. Emergence of influenza A H1N2 reassortant viruses in the human population during 2001. *Virology*, 2002, vol. 300, no. 1, pp. 1–7. doi: 10.1006/viro.2002.1513
22. Hay A.J., Wolstenholme A.J., Skehel J.J. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *The EMBO Journal*, 1985, vol. 4, no. 11, pp. 3021–3024. doi: 10.1002/j.1460-2075.1985.tb04038.x

23. Korotetsky I.S., Zubenko N.V., Shvidko S.V. Genetic changes in influenza A virus genes responsible for formation of drug resistance phenotype. *J. Hum. Virol. Retrovirol.*, 2016, vol. 3, no. 4: 00098. doi: 10.15406/jhvrv.2016.03.00098
24. Nakazawa M., Kadowaki S.E., Watanabe I., Kadowaki Y., Takei M., Fukuda H. PA subunit of RNA polymerase as a promising target for anti-influenza virus agents. *Antiviral. Res.*, 2008, no. 78, pp. 194–201. doi: 10.1016/j.antiviral.2007.12.010
25. Reed L., Muench H. A simple method of estimation fifty percent and pints. *J. Amer. Hyg.*, 1938, vol. 27, no. 3, pp. 493–497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
26. WHO Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva: WHO Press, 2011. 153 p.
27. WHO. Influenza A(H1N1) virus resistance to oseltamivir — 2008/2009 influenza season, northern hemisphere. WHO, 2009. 4 p.
28. Xu X. International circulation of human influenza A (H1N2) reassortant viruses during the 2001-2002 influenza season. *J. Infect. Dis.*, 2002, vol. 186, no. 10, pp. 490–493. doi: 10.1086/344738

---

**Авторы:**

**Глебова Т.И.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан;  
**Кливлеева Н.Г.**, к.б.н., зав. лабораторией биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан;  
**Лукманова Г.В.**, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан;  
**Сактаганов Н.Т.**, научный сотрудник лаборатории биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан;  
**Баймухаметова А.М.**, лаборант лаборатории биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан.

**Authors:**

**Glebova T.I.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Viral Biochemistry, Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan;  
**Klivleyeva N.G.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory of Viral Biochemistry, Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan;  
**Lukmanova G.V.**, Leading Researcher, Laboratory of Viral Biochemistry, Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan;  
**Saktaganov N.T.**, Researcher, Laboratory of Viral Biochemistry, Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan;  
**Baimukhametova A.M.**, Assistant, Laboratory of Viral Biochemistry, Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan.

---

Поступила в редакцию 03.06.2020  
Принята к печати 30.05.2021

Received 03.06.2020  
Accepted 30.05.2021

# ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ И ПРОТЕКТИВНОСТИ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ LIVP-GFP НА ТРЕХ ВИДАХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

С.Н. Щелкунов, А.А. Сергеев, С.Н. Якубицкий, К.А. Титова, С.А. Пьянков

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

**Резюме.** Ликвидация оспы и отсутствие адекватной животной модели оспенной инфекции у человека обуславливает необходимость оценки иммуногенных и протективных свойств создаваемых методами генетической инженерии живых аттенуированных противоспепных вакцин на разных животных моделях ортопоксвирусных инфекций. В данной работе проведено сравнение иммуногенных и протективных свойств рекомбинантного вируса осповакцины (VACV) LIVP-GFP при внутрикожном (в/к) введении мышам, морским свинкам и кроликам. Иммунизирующие дозы вируса LIVP-GFP для всех видов животных составляли  $2 \times 10^4$  или  $2 \times 10^6$  БОЕ. Контрольным животным в/к вводили физиологический раствор. Забор проб крови у животных проводили прижизненно через 28 суток после введения вируса LIVP-GFP или физиологического раствора: у мышей — из ретроорбитального венозного синуса, у морских свинок — из сердца, у кроликов — из краевой вены уха. Из образцов крови отдельных особей были получены сыворотки, в которых методом ИФА определяли титр VACV-специфичных антител. На 30-е сутки эксперимента иммунизированных вирусом LIVP-GFP и контрольных животных интраназально заражали летальными дозами соответствующих ортопоксвирусов, к которым каждый вид животных чувствителен. Мышей заражали вирусом оспы коров (CPXV) GRI-90 в дозе 68 ЛД<sub>50</sub>, морских свинок — VACV GPA в дозе 56 ЛД<sub>50</sub>, кроликов — VACV NB-92 в дозе 100 ЛД<sub>50</sub>. Все контрольные животные после этого погибли, а все животные, иммунизированные аттенуированным рекомбинантным вирусом LIVP-GFP в дозе  $2 \times 10^6$  БОЕ, выжили. При иммунизирующей дозе LIVP-GFP  $2 \times 10^4$  БОЕ выжило 88% мышей после заражения CPXV, 67% кроликов после инфекции VACV NB-92 и 50% морских свинок после заражения VACV GPA. Данные ИФА сывороток крови показали корреляцию уровня VACV-специфичных антител с уровнем протективности, индуцируемым у соответствующих животных. На основании полученных результатов можно заключить, что все три изученные пары «лабораторное животное — ортопоксвирус» позволяют дать адекватную оценку иммуногенности и протективности создаваемых современных аттенуированных вакцин против оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека. При этом мыши линии BALB/c являются наиболее удобным объектом исследования.

**Ключевые слова:** вирус осповакцины, аттенуация, иммунный ответ, антитела, протективность, ортопоксвирусы.

---

**Адрес для переписки:**

Щелкунов Сергей Николаевич  
630559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово,  
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.  
Тел.: 8 903 939-94-80. Факс: 8 383 336-74-09.  
E-mail: snshchel@vector.nsc.ru, snshchel@rambler.ru

**Contacts:**

Sergei N. Shchelkunov  
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo,  
State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector".  
Phone: +7 903 939-94-80. Fax: +7 383 336-74-09.  
E-mail: snshchel@vector.nsc.ru, snshchel@rambler.ru

**Для цитирования:**

Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Якубицкий С.Н., Титова К.А., Пьянков С.А.  
Оценка иммуногенности и протективности вируса осповакцины LIVP-GFP на трех видах лабораторных животных // Инфекция и иммунитет.  
2021. Т. 11, № 6. С. 1167–1172. doi: 10.15789/2220-7619-AIA-1668

**Citation:**

Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., Pyankov S.A.  
Assessing immunogenicity and protectiveness of the vaccinia virus LIVP-GFP in three laboratory animal models // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1167–1172. doi: 10.15789/2220-7619-AIA-1668

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 19-14-00006).*

*This work was financially supported by the Russian Science Foundation (grant 19-14-00006).*

## ASSESSING IMMUNOGENICITY AND PROTECTIVENESS OF THE VACCINIA VIRUS LIVP-GFP IN THREE LABORATORY ANIMAL MODELS

Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., Pyankov S.A.

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

**Abstract.** Smallpox eradication and lack of adequate animal model for smallpox infection underlies a necessity to assess immunogenic and protective properties of genetic engineering-created live attenuated smallpox vaccines in several animal models of orthopoxviral infections. Here we compared immunogenic and protective properties of the recombinant vaccinia virus (VACV) LIVP-GFP intradermally (i.d.) inoculated to mice, guinea pigs and rabbits. LIVP-GFP immunization in all animal species was applied at dose of  $2 \times 10^4$  or  $2 \times 10^6$  PFU. Control animals were injected with saline. Blood sampling was performed on day 28 after virus LIVP-GFP or saline inoculation. Blood samples were taken intravitally from the retro-orbital venous sinus in mice, heart in guinea pigs or marginal ear vein in rabbits. Serum samples were isolated by precipitating blood cells via centrifugation. The serum anti-VACV IgG titers were determined by ELISA. On day 30 post-immunization animals were intranasally challenged with lethal dose of host specific orthopoxvirus species. Mice were infected by cowpox virus (CPXV) strain GRI-90 at dose 68 LD<sub>50</sub>, guinea pigs – by VACV GPA at dose 56 LD<sub>50</sub>, rabbits – by VACV HB-92 at dose 100 LD<sub>50</sub>. All animals in control group died afterwards, whereas all animals immunized by attenuated recombinant virus LIVP-GFP at dose  $2 \times 10^6$  PFU survived. In case of the LIVP-GFP immunization at dose  $2 \times 10^4$  PFU, 88% of mice, 67% of rabbits and 50% of guinea pigs survived after being challenged with species-specific CPXV, VACV HB-92, and VACV GPA. ELISA data for the blood serum samples revealed a correlation between level of VACV-specific antibodies and level of protection in animal species. Based on the data obtained, it could be concluded that all three "animal–orthopoxvirus" models allow to provide with a proper evaluation of immunogenicity and protectiveness for generated modern attenuated vaccines against smallpox and other orthopoxviral human infections. Upon that, it was shown that BALB/c mouse strain was the most convenient investigational host species.

**Key words:** vaccinia virus, attenuation, immune response, antibodies, protectiveness, orthopoxviruses.

### Введение

Вирус осповакцины (*Vaccinia virus*, VACV) стал живой противооспенной вакциной, с помощью которой впервые удалось ликвидировать особо опасное инфекционное заболевание человека [5]. Несмотря на то, что в 1980 г. было объявлено об искоренении оспы и рекомендовано прекратить противооспенную вакцинацию, интерес к VACV вскоре возобновился в связи с возникшей возможностью генноинженерной реконструкции генома этого вируса при направленной встройке чужеродных генов или удалении (делеции) определенных вирусных генов. Такая геномная технология позволила получать стабильно аттенуированные штаммы VACV, продуцирующие антигены различных инфекционных агентов. Создаваемые на основе VACV поливалентные живые вакцины обеспечивают индукцию как антительного, так и Т-клеточного иммунных ответов на чужеродные антигены [11]. В связи с возрастающей угрозой возникновения в результате естественной эволюции ортопоксвирусов, патогенных для человека, в последние годы важной задачей стало создание методами генетической инженерии живых аттенуированных вакцин против ортопоксвирусов [3, 11, 12].

В зависимости от животной модели или способа введения VACV с направленно нарушенными генами вирус может проявлять сниженную в разной степени вирулентность [4, 7, 8, 13], что может обеспечивать разные уровни иммун-

ного ответа на инфекцию. Поэтому при доклинических исследованиях новых кандидатных вакцин на основе VACV необходимо использовать разные животные модели ортопоксвирусных инфекций. При инфицировании мышей тремя разными способами (интраназальным (и/н), внутрикожным (в/к), подкожным) нами было показано, что оптимальным по соотношению «патогенность/иммуногенность» для штамма VACV LIVP-GFP с нарушенным геном тимидинкиназы является в/к введение [2].

Цель данной работы — впервые провести сравнение иммуногенности и протективности (защитного эффекта) аттенуированного штамма LIVP-GFP VACV при его в/к введении мышам линии BALB/c, беспородным морским свинкам или кроликам породы «Шиншилла».

### Материалы и методы

**Вирусы.** В работе использовали следующие штаммы, полученные из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора: штамм GRI-90 вируса оспы коров (CPXV) [1]; штамм LIVP-GFP VACV [9]; штамм HB-92, выделенный из ткани головного мозга кролика породы «Шиншилла», интрацеребрально (и/ц) инфицированного вирусом VACV LIVP; адаптированный к морским свинкам штамм GPA, полученный в результате пассирования штамма HB-92 VACV при и/ц (5 пассажей) и и/н (3 пассажа) заражении морских свинок.

**Животные.** Поскольку в предварительных экспериментах на животных разного пола не выявили достоверных различий у самок и самцов в уровне антител, синтезируемых в ответ на иммунизацию VACV, в данной работе использовали разнополых животных. В исследованиях использовали инбредных 5–6-недельных мышей линии BALB/c массой 13–16 г, беспородных 4-недельных морских свинок массой 210–230 г и 4-месячных кроликов породы «Шиншилла» массой 3,0–3,5 кг, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Исследования и манипуляции на животных были проведены с одобрения комитета по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 08-09.2020 от 25.09.2020).

**Манипуляции с животными.** В/к введение вирусного препарата либо физиологического раствора (ФР) осуществляли мышам в корень хвоста в объеме 30 мкл, морским свинкам — в область таза с предварительно удаленным шерстяным покровом в объеме 100 мкл, кроликам — в область холки с предварительно удаленным шерстяным покровом в объеме 100 мкл. Инфицирующие дозы вируса LIVP-GFP для всех видов животных составляли  $2 \times 10^4$  или  $2 \times 10^6$  БОЕ. Каждая группа экспериментальных животных состояла из 6–8 мышей, 4–6 морских свинок и 3–6 кроликов. Всего в экспериментах было задействовано 46 мышей, 34 морские свинки и 25 кроликов.

Забор проб крови у животных проводили прижизненно через 28 суток после введения препаратов: у мышей — из ретроорбитального венозного синуса с помощью одноразовых стерильных капилляров, у морских свинок — из сердца с помощью шприца объемом 5 мл, у кроликов — из краевой вены уха путем ее прокалывания иглой от шприца объемом 2,5 мл. Из образцов крови отдельных особей была получена сыворотка путем осаждения ее форменных элементов с помощью центрифугирования при 3000–4000 г в течение 7–10 мин. Полученные сыворотки были термически инактивированы при температуре 56°C в течение 30 мин и хранились при минус 20°C.

На 30-е сутки эксперимента (второй день после взятия крови) в/к иммунизированных вирусом LIVP-GFP и контрольных (в/к инъецированных ФР) животных и/н заражали летальными дозами соответствующих ортопоксвирусов. Мышей заражали CPXV GRI-90 в дозе 68 ЛД<sub>50</sub>, морских свинок — VACV GPA в дозе 56 ЛД<sub>50</sub>,

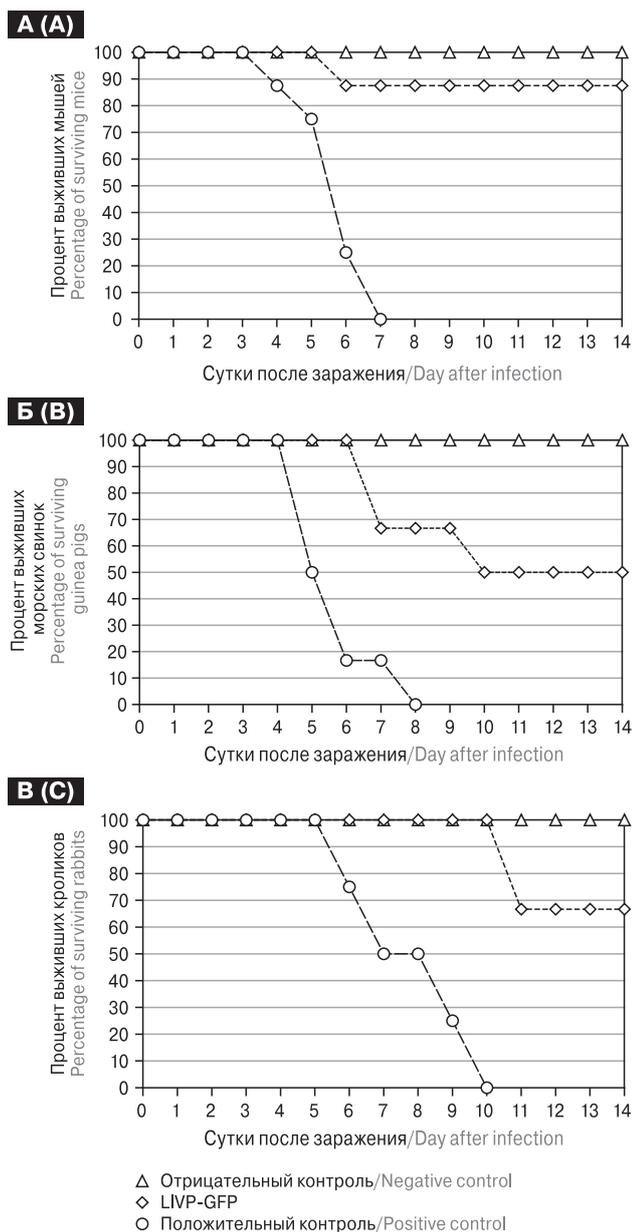
кроликов — VACV HB-92 в дозе 100 ЛД<sub>50</sub>. За животными наблюдали в течение 14 суток и регистрировали у них клинические проявления инфекции и гибель.

**Иммуноферментный анализ сывороток крови экспериментальных животных.** Титр антител к антигенам (вирионным белкам) VACV LIVP определяли методом ИФА. Использовали «Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител к антигенам поксвирусов “Вектор ИФА Покс-АТ” для научных исследований» по ТУ 21.10.60-085-05664012-2019 (далее по тексту — набор реагентов «Вектор ИФА Покс-АТ»). Набор зарегистрирован в Росстандарте России, ФБУ Новосибирский ЦСМ, КЛП № 080/007372 от 03.07.2019. Основой набора является иммуносорбент, на поверхности лунок которого иммобилизован очищенный на сахарозе препарат вирионов VACV LIVP. При выявлении антител в крови животных использован пероксидазный конъюгат белка *A. S. aureus*.

Для сравнения концентрации специфических IgG к VACV в различных образцах применяли титрование. Каждый исследуемый образец в дубле разводили предварительно 1:10 в растворе для предварительного разведения образцов с использованием планшета для предварительного разведения согласно инструкции. Затем предварительно разведенный образец в объеме 20 мкл вносили в верхнюю лунку вертикального ряда планшета-иммуносорбента со 180 мкл раствора для разведения образцов (РРО). Таким образом получали разведение образца 1:100. Перемешивали пипетированием, отбирали 100 мкл и переносили в лунку ниже со 100 мкл РРО, затем после перемешивания в лунку ниже со 100 мкл РРО и т. д. до восьмой нижней лунки вертикального ряда. Получали дублированную серию последовательных двукратных разведений  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$ ,  $\times 800$ ,  $\times 1600$ ,  $\times 3200$ ,  $\times 6400$ ,  $\times 12\ 800$  раз.

Каждый планшет содержал 1 лунку со 100 мкл положительного контрольного образца и 2 лунки по 100 мкл отрицательного контрольного образца.

Анализ результатов проводили согласно инструкции по применению «Вектор ИФА Покс-АТ». Он позволял выявить положительные образцы, то есть имеющие титр не менее 1:100. Для положительных результатов определяли титры. На каждое разведение сыворотки было использовано по 2 лунки планшета (2 повтора). По результатам измерения оптической плотности (ОП) двух лунок рассчитывали среднее арифметическое значение ОП для данного разведения. Далее по инструкции по применению набора рассчитывали критическую оптическую плотность (ОП<sub>крит</sub>) для планшета, которая является верхним пределом фоновых значений отрицательных контролей.



**Рисунок 1. Динамика гибели мышей (А), морских свинок (Б) и кроликов (В), иммунизированных VACV L1VP-GFP в дозе  $10^4$  БОЕ/животное, при интраназальном заражении летальными дозами CPXV GRI-90 (А), VACV GPA (Б), VACV HB-92 (В)**

Figure 1. Mortality rate in mice (A), guinea pigs (B) or rabbits (C) immunized by VACV L1VP-GFP at dose  $10^4$  PFU/animal after intranasal challenge at lethal doses with CPXV GRI-90 (A), VACV GPA (B) or VACV HB-92 (C)

**Примечание.** Приведены данные для групп животных, иммунизированных вирусом L1VP-GFP, а также групп, не иммунизированных L1VP-GFP и не инфицированных (отрицательный контроль) или зараженных (положительный контроль) соответствующим летальным ортопоксвирусом.

Note. Data for animal groups immunized with virus L1VP-GFP or groups unimmunized with L1VP-GFP and uninfected (negative control) or infected (positive control) by corresponding lethal species-specific orthopoxvirus.

Затем проводили сравнение среднеарифметических значений ОП разведений с ОП<sub>крит</sub> для планшета. Титром сыворотки было последнее разведение со значением ОП больше ОП<sub>крит</sub>.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку полученных данных проводили стандартными методами, используя пакет компьютерных программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc. 1984–2001). Нормальность распределения титров антител в сыворотках крови животных оценивали с помощью W-критерия Шапиро–Уилка. В связи с тем, что нормальность распределения титров антител в сыворотках крови иммунизированных дозой  $2 \times 10^4$  БОЕ L1VP-GFP VACV животных была установлена при  $p > 0,05$  только для мышей, межвидовые сравнения титров антител для мышей, морских свинок и кроликов проводили с помощью непараметрического метода — U-критерия Манна–Уитни с определением двусторонней вероятности (p-value). Коэффициент корреляции между индуцированными разными дозами L1VP-GFP VACV титрами антител у животных и наблюдаемыми уровнями защиты от гибели определяли методом Спирмена [10]. Расчет 50% летальной дозы (ЛД<sub>50</sub>) производили на основании показателей количества погибших животных по методу Спирмена–Кербера [10].

## Результаты и обсуждение

Возрастающая в последние годы опасность перехода локальных вспышек зоонозных ортопоксвирусных инфекций среди людей в распространенные эпидемии остро ставит вопрос о необходимости создания живых аттенуированных вакцин нового поколения против этих инфекций и использования адекватных животных моделей для оценки их иммуногенных свойств [3, 8, 13].

В подавляющем большинстве работ свойства создаваемых штаммов VACV изучают на лабораторных мышах [2, 4, 7, 8, 13]. Это обусловлено тем, что мышьяная модель обладает способностью имитировать иммунный ответ на инфекцию VACV, наблюдаемый при противооспенной иммунизации людей. Показано, что суммарные антитела, синтезируемые в организме мышей в ответ на VACV-вакцинацию, узнают схожий спектр вирионных белков, с которыми взаимодействуют антитела сывороток крови вакцинированных пациентов [6].

Расширение спектра биологических систем для оценки свойств кандидатных противооспенных вакцин позволит получать более корректные данные об их иммуногенных и протективных свойствах на этапе доклинических исследований. Поэтому нами проведено сравнение таких свойств аттенуированного штамма L1VP-GFP при в/к иммунизации им не только мышей, но и морских свинок и кроликов.

Для в/к иммунизации мышей, морских свинок и кроликов использовали дозы вирусов  $2 \times 10^6$  и  $2 \times 10^4$  БОЕ/животное. В/к способ иммунизации использовали как наиболее оптимальный по соотношению «иммуногенность—вирулентность» [2]. Для всех трех видов животных прижизненный отбор крови и получение сывороток производили на 28 сутки после иммунизации. Сыворотки анализировали на уровни антител методом ИФА.

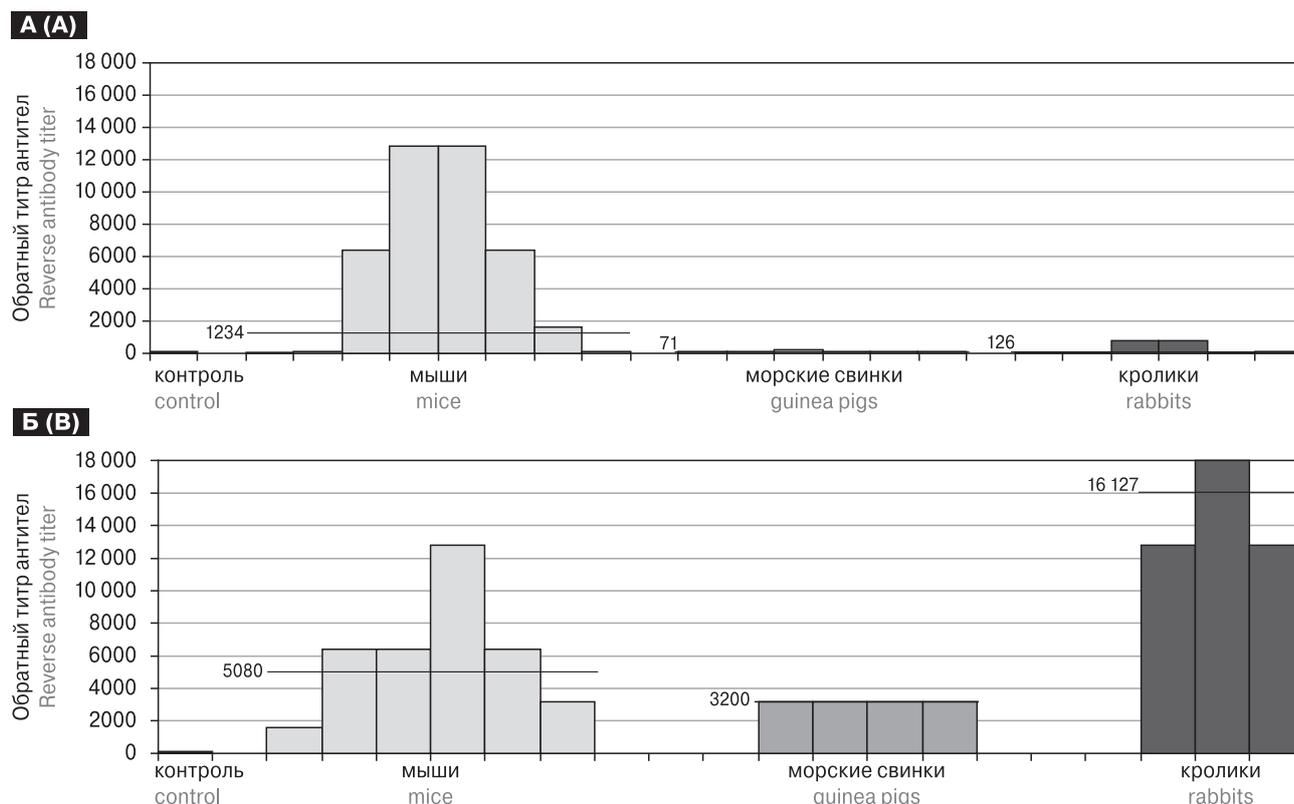
На 30 сутки эксперимента иммунизированных VACV L1VP-GFP и контрольных (инъекцированных ФР) животных и/н заражали летальными дозами соответствующих ортопоксвирусов, к которым каждый вид животных чувствителен.

Все контрольные (не иммунизированные) животные в результате таких заражений погибли: мыши на 4–7 сутки, морские свинки на 5–8 сутки, кролики на 6–10 сутки после инфицирования (рис. 1). Животные всех трех изученных видов, иммунизированные рекомбинантным вирусом L1VP-GFP в дозе  $2 \times 10^6$  БОЕ, выжили после использования летальных доз соответствующих ортопоксвирусов.

При иммунизирующей дозе L1VP-GFP  $2 \times 10^4$  БОЕ выжило после заражения 68 ЛД<sub>50</sub> CPXV 7 из 8 (88%) мышей. При той же дозе иммунизации вирусом L1VP-GFP выжило 4 из 6 (67%) кроликов после инфекции 100 ЛД<sub>50</sub> VACV NB-92. У морских свинок такая доза иммунизации обеспечивала защиту лишь 50% из 6 животных после заражения 56 ЛД<sub>50</sub> VACV GPA (рис. 1).

Данные ИФА сывороток крови (рис. 2А) для меньшей дозы иммунизации ( $2 \times 10^4$  БОЕ) показали высокую корреляцию (коэффициент корреляции  $r = 0,95$ ,  $p < 0,005$ ) уровня VACV-специфичных антител с уровнем протективности, индуцируемым у соответствующих животных.

Таким образом, выполненные эксперименты показали, что все три изученные пары «лабораторное животное – ортопоксвирус» позволяют дать адекватную оценку иммуногенности и протективности создаваемых аттенуированных вариантов противооспенных вакцин новейших поколений. При этом линейные мыши являются наиболее удобным объектом исследования, поскольку обеспечивают при меньших затратах выполнение экспериментов на большем числе животных.



**Рисунок 2. Определенные методом ИФА титры VACV-специфичных антител в сыворотке крови мышей, морских свинок и кроликов, инфицированных VACV L1VP-GFP в дозах  $10^4$  БОЕ (А) и  $10^6$  БОЕ (Б)**  
Figure 2. Serum VACV-specific antibody titer in mice, guinea pigs or rabbits infected by  $10^4$  PFU (A) and  $10^6$  PFU (B) VACV L1VP-GFP assessed by ELISA

**Примечание.** Указано среднее геометрическое значение обратного титра для каждой группы животных.  
Note. The geometric mean of the back titer is indicated for each group of animals.

## Список литературы/References

1. Маренникова С.С., Гашников П.В., Жукова О.А., Рябчикова Е.И., Стрельцов В.В., Рязанкина О.И., Чекунова Э.В., Янова Н.Н., Щелкунов С.Н. Биотип и генетическая характеристика изолята вируса оспы коров, вызвавшего инфекцию ребенка // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1996. № 4. С. 6–10. [Marennikova S.S., Gashnikov P.V., Zhukova O.A., Riabchikova E.I., Strel'tsov V.V., Riazankina O.I., Chekunova E.V., Yanova N.N., Shchelkunov S.N. Biotype and genetic characterization of the isolate of cowpox virus having caused infection in a child. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1996, no. 4, pp. 6–10. (In Russ.)]
2. Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Якубицкий С.Н., Бауэр Т.В., Пьянков С.А. Патогенность и иммуногенность вариантов вируса осповакцины при разных способах введения мышам // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 2. С. 357–364. [Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Yakubitskiy S.N., Bauer T.V., Pyankov S.A. Route-coupled pathogenicity and immunogenicity of vaccinia virus variant inoculated mice. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 2, pp. 357–364. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-PAI-1375
3. Щелкунов С.Н., Щелкунова Г.А. Нужно быть готовыми к возврату оспы // Вопросы вирусологии. 2019. Т. 64, № 5. С. 206–214. [Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. We should be prepared to smallpox re-emergence. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*, 2019, vol. 64, no. 5, pp. 206–214. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-2019-64-5-206-214
4. Belyakov I.M., Earl P., Dzutsev A., Kuznetsov V.A., Lemon M., Wyatt L.S., Snyder J.T., Ahlers J.D., Franchini G., Moss B., Berzofsky J.A. Shared models of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, pp. 9458–9463. doi: 10.1073/pnas.1233578100
5. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and its eradication. Geneva: WHO, 1988. 1460 p.
6. Jones-Trower A., Garcia A., Meseda C.A., He Y., Weiss C., Kumar A., Weir J.P., Merchlinsky M. Identification and preliminary characterization of vaccinia virus (Dryvax) antigens recognized by vaccinia immune globulin. *Virology*, 2005, vol. 343, pp. 128–140. doi: 10.1016/j.virol.2005.08.008
7. Lin L.C.W., Flesch I.E.A., Tschärke D.C. Immunodomination during peripheral vaccinia virus infection. *PLoS Pathog.*, 2013, vol. 9: e1003329. doi: 10.1371/journal.ppat.1003329
8. Moss B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol. Rev.*, 2011, vol. 239, no. 1, pp. 8–26. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x
9. Petrov I.S., Goncharova E.P., Pozdnyakov S.G., Shchelkunov S.N., Zenkova M.A., Vlasov V.V., Kolosova I.V. Antitumor effect of the LIVP-GFP recombinant vaccinia virus. *Doklady Biological Sciences*, 2013, vol. 451. no. 1, pp. 248–252. doi: 10.1134/S0012496613040133
10. Sachs L. Statistische Auswertungsmethoden. Springer Verlag: Heidelberg, Germany, 1972. 193 p.
11. Sanchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses*, 2015, vol. 7, pp. 1726–1803. doi: 10.3390/v7041726
12. Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine*, 2011, vol. 29S, pp. D49–D53. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.037
13. Smith G.L., Benfield C.T.O., de Motes C.M., Mazzon M., Ember S.W.J., Ferguson B.J., Sumner R.P. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J. Gen. Virol.*, 2013, vol. 94, pp. 2367–2392. doi: 10.1099/vir.0.055921-0

## Авторы:

**Щелкунов С.Н.**, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

**Сергеев А.А.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

**Якубицкий С.Н.**, младший научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

**Титова К.А.**, младший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

**Пьянков С.А.**, ведущий научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия.

## Authors:

**Shchelkunov S.N.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head Researcher, Department of Genomic Research, SRC VB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

**Sergeev A.A.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Department of Microorganisms Collection, SRC VB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

**Yakubitskiy A.S.**, Junior Researcher, Department of Genomic Research, SRC VB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

**Titova K.A.**, Junior Researcher, Department of Microorganisms Collection, SRC VB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

**Pyankov S.A.**, Leading Researcher, Department of Microorganisms Collection, SRC VB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.01.2021  
Отправлена на доработку 24.07.2021  
Принята к печати 05.08.2021

Received 17.01.2021  
Revision received 24.07.2021  
Accepted 05.08.2021

# КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕЩЕВОГО РИККЕТСИОЗА, СВЯЗАННОГО С МИКСТ-ИНФИЦИРОВАНИЕМ *RICKETTSIA SIBIRICA* И *CANDIDATUS RICKETTSIA TARASEVICHIAE*

Н.В. Рудаков<sup>1,2</sup>, И.Е. Самойленко<sup>1</sup>, С.В. Штрек<sup>1,2</sup>, С.А. Рудакова<sup>1</sup>, Л.В. Кумпан<sup>1,2</sup>,  
Я.П. Иголкина<sup>3</sup>, В.А. Рар<sup>3</sup>, Е.В. Жираковская<sup>3</sup>, С.Е. Ткачев<sup>3</sup>, Н.В. Тикунова<sup>3</sup>,  
Т.В. Кострыкина<sup>4</sup>, И.А. Блохина<sup>5</sup>, П.А. Ленц<sup>6</sup>

<sup>1</sup> ФБУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, г. Омск, Россия

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия

<sup>3</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Управление Роспотребнадзора по Красноярскому краю, г. Красноярск, Россия

<sup>5</sup> ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае, г. Красноярск, Россия

<sup>6</sup> КГБУЗ Курагинская центральная районная больница, р.п. Курагино, Красноярский край, Россия

**Резюме.** Сибирский клещевой тиф (СКТ) является наиболее распространенным клещевым риккетсиозом (КР) в России, регистрируемым на 17 административных территориях юга Сибири и Дальнего Востока. Целью данного исследования было описание клинической картины, патологоанатомических данных и результатов лабораторной диагностики закончившейся летальным исходом микст-инфекции, вызванной двумя видами наиболее распространенных в России видов риккетсий — патогенной *Rickettsia sibirica* и недостаточно изученной *Candidatus R. tarasevichiae*, включая идентификацию ее этиологического агента. У четырехлетней девочки в Красноярском крае в гиперэндемичном очаге СКТ после присасывания клеща выявлены типичные симптомы КР (струп в месте присасывания, лихорадка, пятнистая сыпь, миалгия) и менингеальный синдром, не характерный для СКТ. Ребенок скончался на седьмой день с момента заболевания. Данные аутопсии (гепатоспленомегалия; отек мозга, который стал непосредственной причиной смерти) и результаты гистологического обследования (продуктивный васкулит головного мозга, спинного мозга и кожи, полиморфно-клеточные периваскулярные инфильтраты в печени и легких, серозный менингит, миелоидная гиперплазия селезенки и лимфатических узлов, интерстициальная лимфоидная инфильтрация в миокарде) подтвердили клинический диагноз клещевого риккетсиоза. Образцы крови и головного мозга пациента были исследованы на наличие широкого спектра клещевых патогенов и кишечных вирусов, вызывающих поражение головного мозга, с помощью ПЦР с последующим секвенированием положительных проб. ДНК *Rickettsia sibirica* и *Candidatus R. tarasevichiae* была обнаружена как в образцах крови, так и головного мозга. *R. sibirica* идентифицирована

## Адрес для переписки:

Рудаков Николай Викторович  
644080, Россия, г. Омск, пр. Мира, 7, ФБУН Омский  
НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора.  
Тел.: 8 (381) 265-16-33.  
E-mail: rickettsia@mail.ru

## Contacts:

Nikolay V. Rudakov  
644080, Russian Federation, Omsk, Mira pr., 7,  
Omsk Research Institute of Natural Focal Infections.  
Phone: +7 (381) 265-16-33.  
E-mail: rickettsia@mail.ru

## Для цитирования:

Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Штрек С.В., Рудакова С.А.,  
Кумпан Л.В., Иголкина Я.П., Рар В.А., Жираковская Е.В., Ткачев С.Е.,  
Тикунова Н.В., Кострыкина Т.В., Блохина И.А., Ленц П.А. Клинико-  
лабораторная характеристика клещевого риккетсиоза, связанного  
с микст-инфицированием *Rickettsia sibirica* и *Candidatus Rickettsia  
tarasevichiae* // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1173–1178.  
doi: 10.15789/2220-7619-CAL-1597

## Citation:

Rudakov N.V., Samoylenko I.E., Shtrek S.V., Rudakova S.A., Kumpan L.V.,  
Igolkina Ya.P., Rar V.A., Zhirakovskaya E.V., Tkachev S.E., Tikunova N.V.,  
Kostrykina T.V., Blokhina I.A., Lents P.A. Clinical and laboratory  
characteristics of tick-borne rickettsiosis related to *Rickettsia sibirica*  
and *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* // Russian Journal of Infection  
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1173–1178.  
doi: 10.15789/2220-7619-CAL-1597

Исследование было частично поддержано грантом Министерства образования и науки России (проект VI.55.1.1: 0309-2016-0002).

The study was partially supported by a grant from the Ministry of Education and Science of Russia (project VI.55.1.1: 0309-2016-0002).

по нуклеотидным последовательностям фрагментов генов *gltA*, *ompA* и *ompB*, а Candidatus *R. tarasevichiae* — по последовательностям фрагментов генов *gltA* и *ompB* с использованием nested-ПЦР и секвенирования. Все амплифицированные фрагменты секвенировали в обоих направлениях; полученные последовательности депонированы в базе данных GenBank под инвентарными номерами МК048467–МК048475. Мы не выявили в образцах другие передаваемые клещами патогены или кишечные вирусы, которые также могут приводить к менингеальному синдрому. Район, в котором произошло присасывание клеща у ребенка, относится к регионам с высоким уровнем заболеваемости СКТ. В этом районе сосуществуют несколько видов клещей; из них *Haemaphysalis concinna*, переносчик *R. sibirica*, доминирует в популяциях иксодовых клещей, в то время как *Ixodes persulcatus*, основной резервуар Candidatus *R. tarasevichiae*, встречается реже. В результате проведенных исследований впервые в Российской Федерации выявлен и описан верифицированный случай летальной инфекции, ассоциированной с риккетсиями двух видов — *Rickettsia sibirica* и Candidatus *R. tarasevichiae*.

**Ключевые слова:** Candidatus *Rickettsia tarasevichiae*, *Rickettsia sibirica*, этиологические агенты, риккетсиозы, клинические проявления, иксодовые клещи.

## CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF TICK-BORNE RICKETTSIOSIS RELATED TO RICKETTSIA SIBIRICA AND CANDIDATUS RICKETTSIA TARASEVICHIAE

Rudakov N.V.<sup>a,b</sup>, Samoylenko I.E.<sup>a</sup>, Shtrek S.V.<sup>a,b</sup>, Rudakova S.A.<sup>a</sup>, Kumpan L.V.<sup>a,b</sup>, Igolkina Ya.P.<sup>c</sup>, Rar V.A.<sup>c</sup>, Zhirakovskaya E.V.<sup>c</sup>, Tkachev S.E.<sup>c</sup>, Tikunova N.V.<sup>c</sup>, Kostyukina T.V.<sup>d</sup>, Blokhina I.A.<sup>e</sup>, Lents P.A.<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>d</sup> Krasnoyarsk Office of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>e</sup> Center for Hygiene and Epidemiology of Krasnoyarsk Krai, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>f</sup> Kuraginsky Central District Hospital, Kuragino, Krasnoyarsk Krai, Russian Federation

**Abstract.** The Siberian tick-borne typhus (STT) is the most common tick-borne rickettsiosis (TBR) in Russia, registered in 17 administrative territories of the Southern Siberia and the Far East. The aim of this study was to describe clinical picture, pathological data and results of laboratory diagnostics during fatal mixed infection caused by two *Rickettsia* species most common in Russia — pathogenic *Rickettsia sibirica* and poorly examined Candidatus *R. tarasevichiae*, including identification of its etiological agents. A four-year-old girl in Krasnoyarsk Krai in a hyperendemic focus of the Siberian tick-borne typhus after tick sucking revealed typical TBR symptoms (scab at the site of tick suction, fever, spotted rash, myalgia) and meningeal syndrome, which is not typical for the Siberian tick-borne typhus. The child died on the seventh day of illness. Autopsy data (hepatosplenomegaly; cerebral edema, which was the immediate cause of death) and the results of histological examination (productive vasculitis of the brain, spinal cord and skin, polymorphic cell perivascular infiltrates in the liver and lungs, serous meningitis, myeloid hyperplasia of the spleen and lymph nodes, interstitial lymphoid infiltration in the myocardium) confirmed the clinical diagnosis of tick-borne rickettsiosis. The patient's blood and brain samples were tested for a wide range of tick-borne pathogens and enteric viruses that cause brain damage using PCR followed by sequencing of the positive samples. The DNA of *Rickettsia sibirica* and Candidatus *Rickettsia tarasevichiae* was found in both blood and brain samples. *R. sibirica* was identified by the nucleotide sequences of gene fragments *gltA*, *ompA* and *ompB*, and Candidatus *R. tarasevichiae* — by the *gltA* and *ompB* genes using nested PCR and sequencing. All amplified fragments were sequenced in both directions; the obtained sequences were deposited in the GenBank database under the inventory numbers МК048467–МК048475. We have not identified other tick-borne pathogens or intestinal viruses in the patient samples able to result in meningeal syndrome. The area where the child was sucked by the tick belongs to the regions with a high incidence of STT. Several species of mites coexist in this area; of these, *Haemaphysalis concinna*, the carrier of *R. sibirica*, dominates the populations of Ixodes mites, while *Ixodes persulcatus*, the main reservoir of Candidatus *R. tarasevichiae*, is less common. As a result of the conducted studies, for the first time in the Russian Federation, a verified case of a lethal infection associated with two species of *Rickettsia* — *Rickettsia sibirica* and Candidatus *R. tarasevichiae* — was identified and described.

**Key words:** Candidatus *Rickettsia tarasevichiae*, *Rickettsia sibirica*, etiological agents, rickettsioses, clinical manifestations, ixodid ticks.

## Введение

В России выявлено несколько клещевых риккетсиозов (КР), наиболее распространенным из которых является сибирский клещевой тиф (СКТ), регистрируемый на 17 административных территориях Сибири [2, 5]. Клинические

проявления СКТ включают лихорадку, первичный аффект (струп) в месте присасывания иксодового клеща, лимфангоит, региональный лимфаденит, пятнисто-папулезную сыпь, головную боль и миалгию [3]. Этиологическим агентом СКТ является *Rickettsia sibirica* subsp. *sibirica*, что было подтверждено идентификацией штаммов

из клещей и от пациентов [16]. *R. sibirica* передается преимущественно клещами родов *Dermacentor* и *Haemaphysalis*; этот агент иногда выявляют в клещах *Ixodes persulcatus* [13, 17].

В дополнение к *R. sibirica*, в иксодовых клещах в Сибири выявлены и другие агенты, которые могут вызывать КР, а именно *Rickettsia heilongjiangensis*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia raoultii* и *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* [9, 13, 17]. На юге Западной Сибири в последние годы лабораторно подтверждено несколько случаев риккетсиозов, вызванных *R. heilongjiangensis* и *R. raoultii* [2, 7, 8]. До настоящего времени клинические случаи, вызванные *Candidatus R. tarasevichiae*, в России не были описаны.

Сибирский клещевой тиф в России считают доброкачественной инфекцией, приводящей к летальным исходам крайне редко [3]. Тем не менее в 2017 г. в Красноярском крае был зарегистрирован случай риккетсиальной инфекции после присасывания иксодового клеща у четырехлетней девочки с типичными симптомами КР (лихорадка, сыпь, струп в месте присасывания клеща, миалгия) и менингеальным синдромом, закончившийся летально. Краткое описание случая представлено ранее [15]. Целью настоящего исследования было описание клинической картины и результатов лабораторной диагностики микст-инфекции, вызванной двумя видами наиболее распространенных в России видов риккетсий — патогенной *Rickettsia sibirica* и недостаточно изученной *Candidatus R. tarasevichiae*, включая идентификацию ее этиологического агента.

## Материалы и методы

Тотальная ДНК была экстрагирована из 100 мкл образцов крови и головного мозга, взятых после вскрытия. Экстракция выполнялась дважды для каждой ткани. Выделение нуклеиновых кислот (НК) проводили с помощью наборов «АмплиПрайм РИБО-преп» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) и «РеалБест экстракция 100» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Выявление НК возбудителей клещевого энцефалита (КЭ), инфекционного клещевого боррелиоза (ИКБ), гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ), моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) проводили методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторах CFX96 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия) и Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Германия), при этом использовали набор «АмплиСенс ТБЕВ, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*-FL», применяя предварительно для проведения обратной транскрипции комплект «Реверта-L» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия), и наборы «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l./PHK ВКЭ», «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum*/*Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis*» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Кроме того, ДНК *Rickettsia* spp. была обнаружена с использованием двухраундовой ПЦР с праймерами для гена *gltA* (табл.), как описано ранее [8]. Для правильного определения в случае возможных микстов двухраундовые реакции проводили независимо, используя праймеры, специфичные для *Candidatus R. tarasevichiae* и риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки (РГ КПЛ). Для последующего секвенирования фрагменты гена *ompA* амплифицировали с использованием двухраундовой ПЦР; фрагменты гена *ompB* амплифицировали независимо, используя двухраундовую ПЦР с праймерами, специфичными для *Candidatus R. tarasevichiae* и риккетсий группы КПЛ (табл.). Полученные фрагменты ДНК были секвенированы и депонированы в GenBank.

Образцы были исследованы в двухраундовой ПЦР на присутствие агентов, передающихся клещами, включая вирус клещевого энцефалита (ТБЕВ), вирус Кемерово, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Borrelia miyamotoi*, бактерии семейства *Anaplasmataceae*, как описано ранее [13]. Кроме того, образцы подвергали скринингу с помощью ПЦР на наличие НК кишечных вирусов: ротавирусной группы А (RVA) и группы С (RVC), норовируса (NoV GI), астровируса (HAstV) и энтеровируса [12, 18].

## Результаты

В мае 2017 г. четырехлетняя девочка была госпитализирована в Идринскую районную больницу через четыре дня после присасывания клеща за левым ухом с жалобами на лихорадку до 39,5°C, головную боль, резкую слабость и сыпь на верхних конечностях. На следующий день сыпь распространилась по всему телу. Пациентка жила в деревне на юге Красноярского края. При поступлении: лихорадка (38,6°C), увеличение до 0,5 см и болезненность заднешейных лимфатических узлов и макулопапулезная сыпь. Обследование сердца, легких и органов брюшной полости не выявило патологии. Предварительным диагнозом был клещевой риккетсиоз, тяжелая форма. Назначенное лечение включало цефотаксим (2 × 650 мг). На четвертый день лечения у девочки наблюдалось снижение температуры до 37,4°C, слабость, анорексия; элементы сыпи становились бледнее. Лабораторные тесты показали лейкопению (2,7 × 10<sup>9</sup> клеток на литр) и лимфопению (9%); остальные показатели крови были в норме. Через пять дней после начала болезни у ребенка начались судороги и брадикардия. На шестой день заболевания лечение было скорректировано: отменен цефотаксим, назначены тетрациклин (3 × 0,05 г) и бензилпенициллин (4 × 500 тыс. ЕД). В течение дня состояние ребенка оставалось среднетяжелым, но ночью резко ухудшилось, развился инфекционно-токсический шок с клонико-тоническими судорогами и брадикардией.

Больная была переведена в отделение интенсивной терапии Курагинской центральной районной больницы. Через несколько часов девочка умерла, несмотря на продолжающуюся интенсивную терапию.

Данные аутопсии (гепатоспленомегалия; отек мозга, который стал непосредственной причиной смерти) и результаты гистологического обследования (продуктивный васкулит головного мозга, спинного мозга и кожи, полиморфно-клеточные периваскулярные инфильтраты в печени и легких, серозный менингит, миелоидная гиперплазия селезенки и лимфатических узлов, интерстициальная лимфоидная инфильтрация в миокарде) подтвердили клинический диагноз КР.

ДНК как *R. sibirica* subsp. *sibirica*, так и *Candidatus R. tarasevichiae* были идентифицированы в образцах крови и мозга с использованием nested-ПЦР и секвенирования. Все амплифицированные фрагменты секвенировали в обоих направлениях; полученные последовательности депонированы в базе данных GenBank под инвентарными номерами МК048467–МК048475. Определенные последовательности генов *gltA*, *ompA* и *ompB* *R. sibirica* (827, 782 и 745 п.н. соответственно) были идентичны соответствующим последовательностям *R. sibirica* subsp. *sibirica* штамм 246 (GenBank NZ\_AABW01000001); выявленные последовательности генов *gltA* и *ompB* *Candidatus R. tarasevichiae* (575 и 741 п.н. соответственно) были идентичны известным последователь-

ностям *Candidatus R. tarasevichiae* из клещей *I. persulcatus* (GenBank AF503167, KR150783).

Все клинические образцы были отрицательными в ПЦР с праймерами, специфичными для других клещевых агентов, включая вирус клещевого энцефалита, вирус Кемерово, *B. burgdorferi sensu lato*, *B. miyamotoi*, *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. и *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* и кишечные вирусы (ротавирусы человека групп А и С, норовирус, астровирус, энтеровирус, пикорнавирусы и аденовирусы).

## Обсуждение

Красноярский край является одним из эндемичных регионов для СКТ. Идринский район, в котором произошло присасывание клеща, относится к регионам с высоким уровнем заболеваемости СКТ (среднепогодный показатель — 80,2 случая на 100 000 человек в 2000–2016 гг.). В этом районе сосуществуют несколько видов клещей; из них *Haemaphysalis concinna*, переносчик *R. sibirica*, доминирует в популяциях иксодовых клещей, в то время как *Ixodes persulcatus*, основной резервуар *Candidatus R. tarasevichiae*, встречается реже. В некоторых исследованиях *R. sibirica* была обнаружена у клещей *I. persulcatus*, а *Candidatus R. tarasevichiae* — у *H. concinna* [6, 13].

Клинические симптомы микст-инфекции, описанные в этом исследовании, отличаются от типичных симптомов СКТ наличием менин-

**Таблица. Праймеры, использованные для ПЦР**

Table. PCR design primers

Гены-мишени Target genes	Реакция Reaction	Последовательность праймера (5'→3') Primer sequence (5'→3')	Размер Length (bp)	Температура отжига Annealing temperature (°C)	Ссылка Reference
<i>Rickettsia</i> spp. <i>gltA</i>	Первичная Primed	<i>glt1</i> (gattgctttacttacgaccc) <i>glt2</i> (tgcatttcttccattgtgc)	1087	52	[7]
	Двухраундовая Nested	<i>glt3</i> (tatagacgggtgataaaggaatc) <i>glt4</i> (cagaactaccgatttcttaagc)	667	53	[7]
<i>Candidatus R. tarasevichiae</i> <i>gltA</i>	Двухраундовая Nested	RT1 (tactaaaaaagtcgctgttcattc) RT2 (tgttgcaaacatcatgcgtaag)	300	56	[7]
РГКПЛ <i>gltA</i> <i>Rickettsia</i> of the group of tick-borne spotted fever <i>gltA</i>	Двухраундовая Nested	RH1 (gtcagctactatcacctatatag) RH3 (taaaatattcatctttaagagcga)	906	54	[9]
<i>Rickettsia</i> spp. <i>ompA</i>	Первичная Primed	A1 (taacattacaagctggaggaagcc) A2 (ttcagagcctgaccaccgg)	1335	58	[7]
	Двухраундовая Nested	A5 (caagtgcgtggtgatgttacta) A6 (tagttacatttctctgcacctac)	975	56	[9]
<i>Rickettsia</i> spp. <i>ompB</i>	Первичная Primed	B1 (atatgcaggatcggtact) B2 (ccatataccgtaagctacat)	1270	56	[7]
	Двухраундовая Nested	B3 (gcaggatcggtactataaac) B4 (aatttacgaacgattacttccgg)	843	56	[7]
<i>Candidatus R. tarasevichiae</i> <i>ompB</i>	Двухраундовая Nested	Btar1 (gcaggctgtttactgtaaagcagc) Btar2 (gcgaaacgaacccccgccttg)	800	59	[9]
РГКПЛ <i>ompB</i> <i>Rickettsia</i> of the group of tick-borne spotted fever <i>ompB</i>	Двухраундовая Nested	BSFG1 (ctaggtcttggaaagcgataacg) BSFG2 (ccgttaaacttagcaccacc)	842	56	[10]

геального синдрома, воспаления сосудов головного и спинного мозга и повреждением печени, легких, селезенки и сердца.

Ранее основным морфологическим объектом в изучении клещевого сыпного тифа являлись биопсированные элементы кожной сыпи, так как отсутствие смертельных случаев исключало возможность широкого морфологического исследования. Только материал с описанием двух секционных случаев СКТ, зарегистрированных в 1950-е гг. в том же Красноярском крае, позволил получить описание патоморфологии СКТ [1]. В протоколе вскрытия отмечается умеренное набухание мозга, гиперплазия селезенки, дистрофические изменения паренхиматозных органов с острым венозным полнокровием. Анемический инфаркт с геморрагическим поясом в левой почке. Патоморфологические изменения в головном мозге представлены в виде эндопераваскулита, отмечаются участки диапедезного кровоизлияния и плазморрагии, тромбо-эндовакулита с очаговой деструкцией сосудистой стенки и периваскулярным отеком. В спинном мозге — перичеллюлярный отек и очень умеренное набухание клеток [1].

Ранее инфекция, вызванная *Candidatus R. tarasevichiae*, были выявлена в Китае. При этом клинические проявления менингита были описаны в летальном случае риккетсиоза, вызванного *Candidatus R. tarasevichiae* [10]. Позднее был описан 61 случай этой инфекции, при этом в 34 случаях наблюдалась коинфекция буньявирусом рода *Phlebovirus*, который вызывает тяжелую лихорадку

с синдромом тромбоцитопении и связан с присасыванием клещей видов *Haemaphysalis longicornis* и *Rhipicephalus microplus*. Смертельный исход был зафиксирован в девяти случаях; восемь из них были вызваны смешанной инфекцией *Candidatus R. tarasevichiae* с буньявирусом [10, 11]. В России этот вирус до настоящего времени не выявлен.

Примечательно, что риккетсии группы тифа и представитель предковой группы *R. canadensis*, ближайший родственник *Candidatus R. tarasevichiae*, поражают главным образом сосуды головного мозга [5].

Случай смешанной инфекции *R. sibirica* и *Candidatus R. tarasevichiae* был описан впервые, и этот случай привел к летальному исходу. Мы не выявили в образцах другие, передаваемые клещами патогены или кишечные вирусы, которые также могут приводить к менингеальному синдрому [14].

Несмотря на высокую распространенность *Candidatus R. tarasevichiae* в клещах *I. persulcatus* в разных областях ареала их обитания [9, 13, 16], мы описываем первый случай летального риккетсиоза, связанного с *Candidatus R. tarasevichiae*. Мы предполагаем, что тяжелые клинические проявления развиваются главным образом в случаях микст-инфекции.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы/References

1. Никонов В.А. Патологоанатомические изменения при клещевом сыпном тифе // Сборник научных трудов Красноярского медицинского института. 1958. № 5. С. 143–144. [Nikonov V.A. Pathological changes in tick-borne typhus. *Sbornik nauchnykh trudov Krasnoyarskogo meditsinskogo instituta = Collection of Scientific Papers of the Krasnoyarsk Medical Institute, 1958, no. 5, pp. 143–144. (In Russ.)*]
2. Рудаков Н.В. Риккетсии и риккетсиозы: руководство для врачей. Омск: ИЦ «Омский научный вестник», 2016. 424 с. [Rudakov N.V. *Rickettsia and rickettsioses: a guidebook for doctors. Omsk: Omsk Science Bulletin, 2016. 424 p. (In Russ.)*]
3. Рудаков Н.В., Оберт А.С. Клещевой риккетсиоз. Омск: Изд-во Омской государственной медицинской академии, 2001. 120 с. [Rudakov N.V., Obert A.S. *Tick-borne rickettsiosis. Omsk: Omsk State Medical Academy Publishing, 2001. 120 p. (In Russ.)*]
4. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Кумпан Л.В., Коломеец А.Н., Абрамова Н.В., Решетникова Т.А., Околелова Н.А. Актуальные аспекты изучения *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2015. № 6. С. 14–19. [Rudakov N.V., Shpynov S.N., Samoylenko I.E., Kumpan L.V., Kolomeets A.N., Abramova N.V., Reshetnikova T.A., Okolelova N.A. Actual aspects of studying *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items, 2015, no. 6, pp. 14–19. (In Russ.)*]
5. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Оберт А.С. Клещевой риккетсиоз и риккетсии группы клещевой пятнистой лихорадки в России. Омск: ИЦ «Омский научный вестник», 2011. 232 с. [Rudakov N.V., Shpynov S.N., Samoylenko I.E., Obert A.S. *Tick-borne rickettsiosis and rickettsia of the group of tick-borne spotted fever in Russia. Omsk: Omskij nauchnyj vestnik Publishing Centre, 2011. 232 p. (In Russ.)*]
6. Cheng C., Fu W., Ju W., Yang L., Xu N., Wang Y.M., Li H., Wang Y.L., Hu M.X., Wen J., Jiao D., Geng C., Sun Y. Diversity of spotted fever group *Rickettsia* infection in hard ticks from Suifenhe, Chinese-Russian border. *Ticks Tick Borne Dis., 2016, vol. 7, no. 5, pp. 715–719. doi: 10.1016/j.ttbdis. 2016.02.023*
7. Granitov V., Shpynov S., Beshlebova O., Arsenjeva I., Dedkov V., Safonova M., Stukolova O., Pantjukhina A., Tarasevich I. New evidence on tick-borne rickettsioses in the Altai region of Russia using primary lesions, serum and blood clots of molecular and serological study. *Microbes Infect., 2015, vol. 17, no. 11–12, pp. 862–865. doi: 10.1016/j.micinf.2015.08.011*
8. Igolkina Y., Krasnova E., Rar V., Savelieva M., Epikhina T., Tikunov A., Khokhlova N., Provorova V., Tikunova N. Detection of causative agents of tick-borne rickettsioses in Western Siberia, Russia: identification of *Rickettsia raoultii* and *Rickettsia sibirica* DNA in clinical samples. *Clin. Microbiol. Infect., 2018, vol. 24, no. 2, pp. 199.e9–199.e12. doi: 10.1016/j.cmi.2017.06.003*
9. Igolkina Y.P., Rar V.A., Yakimenko V.V., Malkova M.G., Tancev A.K., Tikunov A.Y., Epikhina T.I., Tikunova N.V. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Ixodes persulcatus*/*Ixodes trianguliceps* sympatric areas from Western Siberia, Russia: Identification of a new *Candidatus Rickettsia* species. *Infect. Genet. Evol., 2015, vol. 34, pp. 88–93. doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.015*

10. Jia N., Zheng Y.C., Ma L., Huo Q.B., Ni X.B., Jiang B.G., Chu Y.L., Jiang R.R., Jiang J.F., Cao W.C. Human infections with *Rickettsia raoultii*, China. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, vol. 20, pp. 866–888. doi: 10.3201/eid2005.130995
11. Liu W., Li H., Lu Q.B., Cui N., Yang Z.D., Hu J.G., Fan Y.D., Guo C.T., Li X.K., Wang Y.W., Liu K., Zhang X.A., Yuan L., Zhao P.Y., Qin S.L., Cao W.C. Candidatus *Rickettsia tarasevichiae* Infection in Eastern Central China: a case series. *Ann. Intern. Med.*, 2016, vol. 164, no. 10, pp. 641–648. doi: 10.7326/M15-2572
12. Oberste M.S., Maher K., Flemister M.R., Marchetti G., Kilpatrick D.R., Pallansch M.A. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, no. 3, pp. 1170–1174. doi: 10.1128/JCM.38.3.1170-1174.2000
13. Rar V., Livanova N., Tkachev S., Kaverina G., Tikunov A., Sabitova Y., Igolkina Y., Panov V., Livanov S., Fomenko N., Babkin I., Tikunova N. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia. *Parasites Vectors*, 2017, vol. 10, no. 1: 258. doi: 10.1186/s13071-017-2186-5
14. Renaud C., Harrison C.J. Human Parechovirus 3: the most common viral cause of meningoencephalitis in young infants. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 2015, vol. 29, pp. 415–428. doi: 10.1016/j.idc.2015.05.005
15. Rudakov N., Samoylenko I., Shtrek S., Igolkina Y., Rar V., Zhirakovskaia E., Tkachev S., Tikunova N. A fatal case of tick-borne rickettsiosis caused by mixed *Rickettsia sibirica* and “Candidatus *Rickettsia tarasevichiae*” infection in Russia. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2019, vol. 10, no. 6: 101278. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101278
16. Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N., Tarasevich I., Raoult D. Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2006, vol. 1078, pp. 378–383. doi: 10.1196/annals.1374.075
17. Shpynov S.N., Fournier P.E., Rudakov N.V., Samoilenko I.E., Reshetnikova T.A., Yastrebov V.K., Schaiman M.S., Tarasevich I.V., Raoult D. Molecular identification of a collection of spotted fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 2006, vol. 743, pp. 440–443.
18. Zhirakovskaia E., Tikunov A., Klemesheva V., Loginovskikh N., Netesov S., Tikunova N. First genetic characterization of rotavirus C in Russia. *Infect. Genet. Evol.*, 2016, vol. 39, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.meegid.2016.01.001

**Авторы:**

**Рудаков Н.В.**, д.м.н. профессор, директор ФБУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, г. Омск, Россия; зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия;

**Самойленко И.Е.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории зоонозных инфекций отдела природно-очаговых бактериальных зоонозов (ПОБЗ) ФБУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, г. Омск, Россия;

**Штрек С.В.**, к.м.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией зоонозных инфекций отдела природно-очаговых бактериальных зоонозов ФБУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, г. Омск, Россия; доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия;

**Рудакова С.А.**, д.м.н., зав. лабораторией молекулярной диагностики с группой клещевых боррелиозов отдела ПОБЗ, ФБУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, г. Омск, Россия;

**Кумпан Л.В.**, к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия;

**Иголкина Я.П.**, к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия;

**Рар В.А.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия;

**Жираковская Е.В.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия;

**Ткачев С.Е.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия;

**Тикунова Н.В.**, д.б.н., доцент, зав. лабораторией молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия;

**Кострыкина Т.В.**, эпидемиолог, зам. начальника отдела эпидемиологического надзора, Управление Роспотребнадзора по Красноярскому краю, г. Красноярск, Россия;

**Блохина И.А.**, врач-эпидемиолог отдела обеспечения эпидемиологического надзора ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае, г. Красноярск, Россия;

**Ленц П.А.**, врач-патологоанатом КГБУЗ Курагинская центральная районная больница, р.п. Курагино, Красноярский край, Россия.

**Authors:**

**Rudakov N.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation; Head of the Department of Microbiology and Virology and Immunology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;

**Samoylenko I.E.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Natural Focal Infections, Department of Natural Focal Bacterial Zoonoses, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation;

**Shtrek S.V.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Head of the Laboratory of Zoonotic Infections, Department of Natural Focal Bacterial Zoonoses, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation; Associate Professor, Department of Microbiology and Virology and Immunology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;

**Rudakova S.A.**, PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Molecular Diagnostics with a Group of Tick-borne Borreliosis, Department of Natural Focal Bacterial Zoonoses, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation;

**Kumpan L.V.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Microbiology and Virology and Immunology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;

**Igolkina Ya.P.**, PhD (Biology), Junior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation;

**Rar V.A.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation;

**Zhirakovskaya E.V.**, PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation;

**Tkachev S.E.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation;

**Tikunova N.V.**, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation;

**Kostrykina T.V.**, Epidemiologist, Deputy Head of the Epidemiological Surveillance Department, Krasnoyarsk Office of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Blokhina I.A.**, Epidemiologist of the Epidemiological Surveillance Department, Center for Hygiene and Epidemiology of Krasnoyarsk Krai, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Lents P.A.**, Pathologist, Kuraginsky Central District Hospital, Kuragino, Krasnoyarsk Krai, Russian Federation.

# КОРЬ В ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ В 2019–2020 гг.: ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ

И.Н. Лаврентьева<sup>1</sup>, М.А. Бичурина<sup>1</sup>, А.Ю. Антипова<sup>1</sup>, Ж. Камара<sup>2</sup>,  
Н'Ф. Магассуба<sup>2</sup>, С.А. Егорова<sup>1</sup>, Арег А. Тотолян<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Университет имени Гамалы Абдель Насера, г. Конакри, Гвинейская Республика

**Резюме.** *Введение.* В связи с эпидемией лихорадки Эбола в государствах Западной Африки, в том числе и в Гвинейской Республике, имело место нарушение программы иммунизации против кори. Доля серонегативных к вирусу кори в 2017 г. составила 52,4% от числа обследованных лиц. В 2018 г. была выявлена высокая доля заболевших корью среди детей 1–5 лет (61,6%). Для купирования вспышки в 2018 г. в Гвинейской Республике проведена кампания дополнительной иммунизации населения префектур Конакри и Нзерекоре. Цель настоящего исследования — изучение эпидемической ситуации по кори и оценка популяционного иммунитета к вирусу кори в Гвинейской Республике в 2019–2020 гг. *Материалы и методы.* На наличие специфических антител ретроспективно были тестированы 1697 образцов сывороток крови жителей разных регионов страны, в возрасте от 7 месяцев до 76 лет, полученных в 2019–2020 гг. Использованы ИФА-тест-системы Anti-Measles Virus ELISA (IgM) Euroimmun и Anti-Measles Virus ELISA (IgG) Euroimmun (Германия). Наличие в сыворотке крови IgM-антител к вирусу кори оценивали как острую коревую инфекцию. Статистический анализ выполняли с помощью пакета программ Statistica 6.0. *Результаты.* На наличие IgM-корь исследовано 638 сывороток крови, в 46,6% случаев диагноз подтвержден лабораторно. Наибольшая доля от общего числа заболевших (61,6%) — дети 1–4 лет. Вторая по значимости возрастная группа 5–9 лет, третья — дети до 1 года: 18,5 и 11,8% от общего числа заболевших соответственно. Корь регистрировалась у привитых в 7,4% от общего числа лабораторно подтвержденных случаев. На IgG-корь обследовано 1059 человек. Самый низкий показатель серопревалентности установлен среди детей до 4 лет (47,8%), самый высокий (85,5%) — среди лиц 40 лет и старше. *Заключение.* Корь в Гвинейской Республике остается слабо контролируемой инфекцией. Как и в предыдущие годы наблюдения (2017–2018 гг.), дети до 5 лет являются наиболее уязвимой когортой населения, несмотря на проведенную в 2018 г. в ряде регионов страны кампанию дополнительной иммунизации. Еще больше проблем с контролем коревой инфекции в Гвинее ожидается начиная с 2021 г., поскольку наряду с эпидемией COVID-19 в стране вновь регистрируется лихорадка Эбола. Гвинейская Республика остро нуждается в помощи мирового сообщества для реализации программы ВОЗ по элиминации кори в глобальном масштабе.

**Ключевые слова:** корь, Гвинейская Республика, возрастная группа, популяционный иммунитет.

---

**Адрес для переписки:**

Лаврентьева Ирина Николаевна  
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,  
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.  
Тел.: 8 (812) 232-94-11 (служебн.), 8 921 341-05-01 (моб.).  
E-mail: pasteur.lawr@mail.ru

**Contacts:**

Irina N. Lavrentieva  
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,  
St. Petersburg Pasteur Institute.  
Phone: +7 (812) 232-94-11 (office), +7 921 341-05-01 (mobile).  
E-mail: pasteur.lawr@mail.ru

**Для цитирования:**

Лаврентьева И.Н., Бичурина М.А., Антипова А.Ю., Камара Ж.,  
Магассуба Н'Ф., Егорова С.А., Тотолян Арег А. Корь в Гвинейской  
Республике в 2019–2020 гг.: эпидемические особенности  
и популяционный иммунитет // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6.  
С. 1179–1184. doi: 10.15789/2220-7619-MIT-1739

**Citation:**

Lavrentieva I.N., Bichurina M.A., Antipova A.Yu., Camara J.,  
Magassouba N'F., Egorova S.A., Totolian Areg A. 2019–2020 measles in the Republic of Guinea:  
epidemic features and herd immunity // Russian Journal of Infection  
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1179–1184.  
doi: 10.15789/2220-7619-MIT-1739

**2019–2020 MEASLES IN THE REPUBLIC OF GUINEA: EPIDEMIC FEATURES AND HERD IMMUNITY**Lavrentieva I.N.<sup>a</sup>, Bichurina M.A.<sup>a</sup>, Antipova A.Yu.<sup>a</sup>, Camara J.<sup>b</sup>, Magassouba N’F.<sup>b</sup>, Egorova S.A.<sup>a</sup>, Totolian Areg A.<sup>a</sup><sup>a</sup> St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation<sup>b</sup> Gamal Abdel Nasser University, Conakry, Republic of Guinea

**Abstract.** *Introduction.* In connection with the Ebola epidemic in the West African countries, including the Republic of Guinea, a failure in implementing measles immunization program was noted. A proportion of measles seronegative subjects in 2017 was 52.4% of total examined individuals. In 2018, a high proportion of measles cases among children aged 1–5 years (61.6%) was identified. In order to stop the 2018 outbreak, the Supplemental Immunization Campaign was conducted in the Konakri and Nzerekore prefectures in the Republic of Guinea. The aim of this study was to examine the 2019–2020 measles epidemic situation and assess the measles population immunity in the Republic of Guinea. *Materials and methods.* Measles-specific antibodies were examined in 1697 blood serum samples collected from residents of different regions of the Republic of Guinea, aged from 7 months to 76 years, obtained in 2019–2020, and tested retrospectively. The ELISA test systems Anti-Measles Virus ELISA (IgM) Euroimmun and Anti-Measles Virus ELISA (IgG) Euroimmun (Germany) were used. The presence of serum IgM measles antibodies was considered as acute measles infection. Statistical analysis was performed using the software package Statistica 6.0. *Results.* Blood sera (n = 638) were tested for IgM-measles, and in 46.6% of cases the diagnosis was confirmed by laboratory tests. The biggest proportion of the total cases (61.6%) was found in children aged 1–4 years. The second most important age group was 5–9 years of age, the third is children under 1 year: 18.5% and 11.8% of the total number of patients, respectively. Measles infection was registered in vaccinated patients in 7.4% of the total number of laboratory-confirmed cases. 1059 subjects were examined for IgG measles antibody. The lowest seroprevalence rate was found among children under 4 years of age (47.8%). The highest (85.5%) was found among subjects of 40 years old and older. *Conclusion.* Measles in GR remains a poorly controlled infection. As in the previous years of observation (2017–2018), children under 5 years of age are the most vulnerable cohort of the population, despite the 2018 DI campaign conducted in a number of GR territories. More problems with the measles control in the Republic of Guinea are expected in the period from 2021, as along with the COVID-19 epidemic, Ebola is repeatedly registered in the country. The Republic of Guinea particularly requires assistance from the international community to implement the WHO measles elimination program on a global scale.

**Key words:** measles, Republic of Guinea, age group, herd immunity.

## Введение

Стратегический план Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по элиминации кори предусматривал снижение смертности от кори на 95% по сравнению с показателями 2000 г. и достижения элиминации кори в пяти регионах ВОЗ [9, 10].

Однако до настоящего времени в мире возникают крупные вспышки этого заболевания [1, 2, 6]. Так, в 2019 г. в мире было выявлено 524 718 случаев кори [12]. Имели место большие вспышки кори на Мадагаскаре (151 032 случая), в Индии (76 588 случаев), на Филиппинах (46 689 случаев), в Нигерии (27 195 случаев) и других странах. Подъем заболеваемости корью наблюдался в 2017–2018 гг. и в Гвинейской Республике (ГР) [3]. По данным ВОЗ, в 2017 г. было зарегистрировано 596 случаев, а в 2018 г. — 516 случаев кори.

В предыдущие годы имело место нарушение программы иммунизации против всех инфекций, в том числе и против кори, в связи с эпидемией лихорадки Эбола в государствах Западной Африки, включая и ГР [8]. Доля серонегативных к вирусу кори в 2017 г. среди лиц от 7 месяцев до 22 лет составила 52,4%. Высокая доля восприимчивых к кори среди детей и молодых людей способствовала поддержанию эпидемического процесса в Гвинее и в 2018 г. [3]. В этот период была выявлена высокая доля за-

болевших корью среди детей в возрасте от года до пяти лет (61,6%). Для купирования вспышки в 2018 г. в ГР была проведена кампания дополнительной иммунизации населения двух префектур: Конакри и Нзерекоре [7]. Важно оценить, как повлияли эти мероприятия на течение эпидемического процесса кори и на уровень популяционного иммунитета в разных группах населения.

Цель настоящего исследования — изучение эпидемической ситуации по кори и оценка популяционного иммунитета к вирусу кори в ГР в 2019–2020 гг.

## Материалы и методы

На наличие антител к вирусу кори ретроспективно были тестированы сыворотки крови жителей ГР в возрасте от 7 месяцев до 76 лет, проживающих в префектурах Боке, Конакри, Фарана, Канкан, Киндиа, Нзерекоре. Сыворотки получены из Национальной лаборатории по надзору за корью в ГР в период с января 2019 по февраль 2020 г. Всего исследовано 1697 образцов, в том числе:

- 638 сывороток крови, полученных от больных с макулопапулезной сыпью и клиническим диагнозом «корь»,
- 1059 сывороток крови от практически здоровых лиц разного возраста.

Иммуноглобулины классов М и G к вирусу кори выявляли в ИФА с тест-системами Anti-Measles Virus ELISA (IgM) Euroimmun (Германия) и Anti-Measles Virus ELISA (IgG) Euroimmun (Германия). Наличие в сыворотке крови IgM-антител к вирусу кори оценивали как острую коревую инфекцию.

Статистический анализ выполняли с помощью пакета программ Statistica 6.0. Использовали параметрические и непараметрические методы. Оценка статистической значимости корреляционной связи осуществлялась с помощью t-критерия. В качестве порога достоверности отличий было определено значение вероятности  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В 2019–2020 гг. на наличие IgM-корь было исследовано 638 сывороток крови, полученных от больных разного возраста с общеинфекционным синдромом, лихорадкой и наличием макулопапулезной сыпи и/или энантемы. Сыворотки были распределены на 5 возрастных групп: I — дети до 1 года; II — от 1 до 4 лет; III — от 5 до 9 лет; IV — от 10 до 14 лет; V — лица 15 лет и старше.

Наибольшее количество лабораторно обследованных пришлось на возрастные группы 1–4 и 5–9 лет: 361 и 134 больных соответственно. Достаточно много заболевших с первичным диагнозом «корь» ( $n = 85$ ) было выявлено среди детей в возрасте до 1 года. У детей от 10 до 14 лет существенно реже наблюдали заболевание с клинической картиной кори: у 36 лиц из общего числа обследованных, а в группе подростков старше 15 лет и взрослых корь была заподозрена только у 22 человек.

В целом из 638 больных у 297 (46,6±1,97%) клинический диагноз «корь» был подтвержден лабораторно (табл. 1).

Наибольшее количество заболевших из общего числа ( $n = 297$ ) пришлось на II возрастную группу (1–4 года) и составило 183 (61,6%), или 28,7±1,79% от общего числа обследованных ( $n = 638$ ).

Второй по значимости оказалась III возрастная группа, где инфекция была выявлена у 55 (18,5%) от общего числа заболевших корью, или у 8,6±1,11% от числа лабораторно обследованных. Важно отметить и существенную долю больных корью детей I возрастной группы (до 1 года): 35 человек, или 11,8% от общего числа заболевших. Значительно реже корь выявлялась в IV и V возрастных группах: у 15 (5%) и 9 (3,1%) человек соответственно от общего количества заболевших.

При анализе структуры заболевших корью в зависимости от вакцинального статуса оказалось, что основную часть больных составили не привитые против кори лица и лица с неизвестным анамнезом: 189 (63,6±1,81%) и 86 (29,0±1,35%) соответственно. Однако корь регистрировалась и у 22 человек (7,4±0,72%), имевших документированные сведения о прививках.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в 2019–2020 гг., как и в предыдущий период (2017–2018 гг.), корь в ГР достаточно активно распространялась, в том числе и среди лиц, привитых против этой инфекции, с вовлечением в эпидемический процесс в основном детей в возрасте до 14 лет.

Продолжающееся активное течение эпидемического процесса кори в ГР обуславливает необходимость осуществления динамического наблюдения за формированием популяционного иммунитета против вируса кори в этой стране.

С этой целью в 2019–2020 гг. на IgG-антитела к вирусу кори было обследовано 1059 человек в возрасте от 7 месяцев до 76 лет, распределенных на восемь возрастных групп. Результаты представлены в табл. 2.

**Таблица 1. Выявление специфических IgM к вирусу кори в образцах сывороток крови жителей Гвинейской Республики разных возрастных групп**

Table 1. Identification of serum specific anti-measles IgM antibodies in residents of the Republic of Guinea in various age groups

№ группы Group No.	Возраст, лет Age, years	Число исследованных образцов сывороток крови, абс. Number of serum samples examined, abs.	Из них IgM«+» к вирусу кори Of these, IgM«+» to measles virus	
			Количество от общего числа обследованных, абс./M±m, % The number of the total number of surveyed subjects, abs./M±m, %	Доля лиц данной возрастной группы от общего числа заболевших, % Percentage of persons in this age group of the total number of cases, %
I	< 1	85	35/5,5±0,90	11,8±1,87
II	1–4	361	183/28,7±1,79	61,6±2,82
III	5–9	134	55/8,6±1,11	18,5±2,53
IV	10–14	36	15/2,4±0,60	5,0±1,27
V	15 и старше 15 and older	22	9/1,4±0,47	3,1±0,99
Всего/Total		638	297/ 46,6±1,97	100,0

**Таблица 2. Выявление специфических IgG к вирусу кори у жителей Гвинейской Республики в разных возрастных группах в 2019–2020 гг.**

Table 2. 2019–2020 identification of specific anti-measles IgG antibodies in residents of the Republic of Guinea in various age groups

№ группы Group No.	Возраст, лет Age, years	Число исследованных образцов сывороток крови, абс. Number of blood serum samples examined, abs.	Из них IgG «+» к вирусу кори In these IgG «+» to Measles virus	
			абс. abs.	Доля серопозитивных, M±m, % Percentage of seropositive, M±m, %
I	< 1	33	14	42,4±8,60
II	1–4	151	74	49,0±4,07
III	5–9	72	46	63,9±5,66
IV	10–14	34	28	82,3±6,83
V	15–19	126	89	70,6±4,00
VI	20–29	323	232	71,8±2,22
VII	30–39	214	176	82,2±1,73
VIII	40 и старше 40 and older	106	91	85,8±3,39
<b>Всего/Total</b>		1059	750	70,8±1,39

В целом среди обследованного населения республики 70,8% лиц имели IgG-антитела против вируса кори (без существенных гендерных различий). Доля серопозитивных женщин составила 75,7±1,92%, мужчин — 77,2±2,45%.

Анализ возрастной структуры показал, что самая высокая доля серопозитивных (85,5%) регистрируется в VIII возрастной группе (40 лет и старше), что, видимо, связано с предыдущим инфицированием, учитывая пожизненный иммунитет после перенесенной инфекции.

Самый низкий показатель серопревалентности установлен среди детей I и II возрастных групп: совокупно их доля составила 47,8% (p < 0,05). Как и в предыдущие годы [3, 4, 5], дети до 5 лет остаются самой уязвимой когортой населения, несмотря на то, что в 2018 г. в ГР была проведена кампания дополнительной иммунизации.

Далее было изучено распределение IgG-корь-позитивных сывороток, полученных от лиц старше 15 лет в пяти муниципалитетах префектуры Конакри, а именно Диксин, Калум, Матам, Матото, Ратома.

Наибольшее число образцов было получено из двух муниципалитетов: Матото и Ратома (307

и 246 соответственно). Доля IgG-позитивных образцов колебалась от 73,3% в Матото до 81,9% в Калуме без статистически значимых различий.

Однако при более детальном рассмотрении показателей по отдельным районам этих двух муниципалитетов были выделены территории, где доля положительных находок была выше. Так, в муниципалитете Диксин в целом было выявлено 73,3% IgG-положительных образцов, тогда как в центральном районе Диксина — 91,7%. Аналогичные результаты получены и в Матаме: в целом по муниципалитету выявили 74,4% серопозитивных, тогда как в центральном районе Матама — 90,9%. Вероятно, эта ситуация связана с более активным распространением кори в многонаселенных районах, вследствие чего и сформировалась достаточно высокая иммунная прослойка среди проживающего там населения.

Оценка напряженности популяционного иммунитета напрямую связана с количественным определением уровня IgG-корь-антител в разных возрастных группах. Распределение сывороток крови, полученных от жителей ГР в 2019 г., по уровню IgG-корь-антител представлено в табл. 3.

**Таблица 3. Распределение сывороток крови по уровню IgG-корь-антител у лиц в Гвинейской Республике**

Table 3. Distribution of blood sera by level of anti-measles IgG antibodies in individuals in the Republic of Guinea

Уровень IgG-антител, МЕ/л IgG antibody levels, IU/l	Возраст, лет/Age, years				Всего абс./% Total abs./%
	15–19 абс./% abs./%	20–29 абс./% abs./%	30–39 абс./% abs./%	40 и старше абс./% 40 and more abs./%	
≤ 275,0	37/22,4±3,05	91/28,2±3,31	38/17,7±2,61	15/14,1±2,56	181/23,3±3,13
> 275,0 – ≤ 1000,0	59/46,8±4,45	156/48,3±2,78	104/48,6±3,42	43/40,6±4,77	362/46,9±2,62
> 1000,0 – < 3000,0	15/11,9±2,89	35/10,8±1,73	33/15,4±2,47	24/22,6±4,06	107/13,9±3,34
≥ 3000,0	15/11,9±2,89	41/12,7±1,85	39/18,2±2,64	24/22,6±4,06	119/15,4±3,30
<b>Всего/Total</b>	126/16,3±3,29	323/41,8±2,74	214/27,7±3,05	106/13,7±3,33	772

В соответствии с инструкцией изготовителя тест-системы на IgG-корь сыворотки с показателем менее 275 МЕ/л считали отрицательными. Сыворотки крови с показателем более 275 МЕ/л были условно распределены на три группы. К первой группе отнесены сыворотки с показателем 275,0–1000,0 МЕ/л (условно «низкие» титры), ко второй группе отнесены сыворотки с показателем от 1000,0 до 3000,0 МЕ/л, в третью вошли образцы с показателем более 3000,0 МЕ/л.

Среди лиц 15 лет и старше доля серонегативных составила 23,8%, в то время как среди детей до 5 лет она составила 47,8% ( $p < 0,05$ ). Около половины лиц старше 15 лет (46,9%) имели титр IgG-корь до 1000,0 МЕ/л, и это, возможно, постпрививочные антитела. В то же время у 15,4% лиц был обнаружен высокий уровень IgG-корь-антител ( $\geq 3000,0$  МЕ/л), что может свидетельствовать о недавно перенесенном заболевании. Статистически значимо ниже доля серонегативных лиц в возрастных группах 40 лет и старше по сравнению с двумя возрастными группами: 15–19 и 20–29 лет ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, корь в ГР в 2019 и первой половине 2020 г. продолжала распространяться так же активно, как и в предшествующие два года [3]. Доля IgM-положительных образцов от числа исследованных составила 47,2% (2017–2018 гг.) и 46,6% (2019–2020 гг.), с существенным преобладанием детей младших возрастных групп в структуре заболевших за все четыре года наблюдений. Полученные результаты свидетельствуют о недостатках плановой вакцинации против кори в Гвинее, которую, согласно национальному календарю профилактических прививок, проводят в возрасте 9 месяцев, что должно защитить детей младших возрастных групп от инфекции. Однако, как и в предыдущие годы, среди детей до 5 лет выявлена самая низкая доля серопозитивных к вирусу кори лиц (47,8%;  $p < 0,05$ ). Эта группа остается самой уязвимой несмотря на дополнительную иммунизацию (ДИ) в провинциях Конакри и Нзерекоре, проведенную в 2018 г. Очевидно, что для ощутимого снижения заболеваемости кампании ДИ должны быть направлены прежде всего на иммунизацию детей до 5 лет в масштабах всей страны для создания прочного коллективного иммунитета именно в этой, эпидемически значимой когорте населения. Но также понятно, что реализация массовой иммунизации детей ГР сопряжена с существенными экономическими и с организационными трудностями.

## 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 Infectology*, 2013, vol. 5, no. 2, pp. 96–102. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2013-5-2-96-102

Полученные нами результаты лабораторного обследования больных корью и условно здоровых жителей ГР подтверждаются эпидемиологическими данными ВОЗ

По официальным данным ВОЗ, в 2019 г. в ГР было зарегистрировано 1208 случаев кори (показатель заболеваемости составил 100,6 на 1 млн населения), в 2020 г. — 529 случаев (показатель заболеваемости — 44,1 на 1 млн населения) [11]. В марте–мае 2019 г. отмечен подъем заболеваемости корью, ежемесячно фиксировалось от 200 до 300 случаев. В 2020 г. только в январе выявлено около 500 случаев кори, в последующие месяцы после развития эпидемии COVID-19 корь регистрировалась в единичных случаях. Однако в 2020 г. тенденция распространения кори среди детского населения страны сохранилась — самые высокие показатели заболеваемости были отмечены в трех возрастных группах: дети до года — 65,4, от 1 года до 5 лет — 69,4, от 5 до 10 лет — 22,0 на 1 млн лиц каждой возрастной группы.

Особую тревогу вызывает тот факт, что заболевшие корью в ГР регистрируются и среди привитых против этой инфекции. Возможно, это связано с недостаточным иммунным ответом на однократную иммунизацию детей в возрасте 9 месяцев. Нельзя также исключать снижения прививочных свойств вакцин из-за нарушения «холодовой цепи» в процессе транспортировки иммунобиологических препаратов в условиях тропического климата.

## Заключение

Несмотря на проведение плановой иммунизации детей в возрасте 9 месяцев и дополнительную иммунизацию в ряде регионов страны, корь в ГР продолжает оставаться малоконтролируемой инфекцией и активно распространяется среди детей младших возрастных групп, что отмечено за четырехлетний период наблюдения (2017–2020 гг.).

Еще больше проблем с контролем коревой инфекции в ГР ожидается начиная с 2021 г., поскольку наряду с эпидемией COVID-19 в стране вновь регистрируется лихорадка Эбола. Понятно, что все силы национального здравоохранения сосредоточены на борьбе с особо опасными инфекциями и ГР особо остро нуждается в помощи мирового сообщества для реализации программы ВОЗ по элиминации кори в глобальном масштабе.

2. Камара Дж., Антипова А.Ю., Бичурина М.А., Зарубаев В.В., Магассуба Н'Ф., Лаврентьева И.Н. Осуществление программы элиминации кори в Африканском регионе ВОЗ // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 449–456. [Camara J., Antipova A.Yu., Bichurina M.A., Zarubaev V.V., Magassouba N., Lavrentieva I.N. Implementation of the program of measles elimination in the who African Region. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 449–456. (In Russ.)] doi: 10.15789/22207619201934449456
3. Лаврентьева И.Н., Бичурина М.А., Антипова А.Ю., Камара Ж., Магассуба Н. Выявление случаев кори в Гвинейской Республике в 2017–2018 гг. // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 3. С. 570–574. [Lavrentieva I.N., Bichurina M.A., Antipova A.Y., Camara J., Magassouba N. Detection of measles cases in the Republic of Guinea in 2017–2018. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 3, pp. 570–574. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-DOM-1333
4. Попова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Железнова Н.В., Антипова А.Ю., Щербакова С.А., Буаро М.Й., Тотолян А.А. Изучение уровня иммунитета к вирусу кори в отдельных группах населения Гвинейской Республики в рамках Глобальной программы элиминации кори. Сообщение 1 // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 353–358. [Popova A.Yu., Bichurina M.A., Lavrentyeva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu., Shcherbakova S.A., Boiro M.Y., Totolian A.A. Measles virus immunity level study in particular population groups of the Republic of Guinea within the framework of global measles elimination program. Report 1. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 353–358. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-353-358
5. Попова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Железнова Н.В., Антипова А.Ю., Щербакова С.А., Буаро М.Й., Тотолян А.А. Изучение уровня иммунитета к вирусу кори в отдельных группах населения Гвинейской Республики в рамках Глобальной программы элиминации кори. Сообщение 2 // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 1. С. 79–84. [Popova A.Yu., Bichurina M.A., Lavrentyeva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu., Shcherbakova S.A., Boiro M.Y., Totolian A.A. Measles virus immunity level study in particular population groups of the Republic of Guinea within the framework of global measles elimination program. Report 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 79–84. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-79-84
6. Masresha B.G., Dixon M.G., Kriss J.L., Katsande R., Shibeshi M.E., Luce R., Fall A., Dosseh A.R.G.A., Byabamazima Ch.R., Dabbagh A.J., Goodson J.L., Mihigo R. Progress toward measles elimination — African Region, 2013–2016. *MMWR*, 2017, vol. 66, no. 17, pp. 436–443. doi: 10.15585/mmwr.mm6617a2
7. Roberts L. How COVID hurt the fight against other dangerous diseases. *Nature*, 2021, vol. 592, no. 7855, pp. 502–504. doi: 10.1038/d41586-021-01022-x
8. Takahashi S., Metcalf J.E., Ferrari M.J., Moss W.J., Truelove Sh.A., Tatem A.J., Grenfell B.T., Lessler J. Reduced vaccination and the risk of measles and other childhood infections post-Ebola. *Science*, 2015, vol. 347, no. 6227, pp. 1240–1242. doi: 10.1126/science.aaa3438
9. WHO. Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection: WHO European Region strategic plan 2005–2010. *Copenhagen: WHO*, 2005. 34 p.
10. WHO. Global measles and rubella strategic plan: 2012–2020. *Geneva: WHO*, 2012. 77 p.
11. WHO. Provisional monthly measles and rubella data. Country slides (Measles). URL: <https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/immunization-analysis-and-insights/surveillance/monitoring/provisional-monthly-measles-and-rubella-data> (18.05.2021)
12. WHO. Reported measles cases and incidence rates by WHO Member States, as of 10 Oct 2019. URL: [https://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/vpd/surveillance\\_type/active/measles\\_monthlydata/en](https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/active/measles_monthlydata/en) (22.10.2019)

**Авторы:**

**Лаврентьева И.Н.**, д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 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;  
**Антипова А.Ю.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;  
**Камара Ж.**, научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок Университета Гамалея Абдель Насера, г. Конакри, Гвинейская Республика;  
**Магассуба Н'Ф.**, к.б.н., зав. лабораторией геморрагических лихорадок Университета Гамалея Абдель Насера, г. Конакри, Гвинейская Республика;  
**Егорова С.А.**, д.м.н., зам. директора по инновациям ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;  
**Тотолян Арег А.**, д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Lavrentieva I.N.**, PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, 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;  
**Antipova A.Yu.**, PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Camara J.**, Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Gamal Abdel Nasser University, Conakry, Republic of Guinea;  
**Magassouba N'F.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Gamal Abdel Nasser University, Conakry, Republic of Guinea;  
**Egorova S.A.**, PhD, MD (Medicine), Deputy Director for Innovation, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Totolian Areg A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

# BLOCKADE OF LIRs AS A NEW APPROACH FOR DIAGNOSTICS AND TREATMENT OF ATLL MALIGNANCY

M. Keikha<sup>a</sup>, M. Karbalaeei<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>b</sup> Jiroft University of Medical Sciences, Jiroft, Iran

**Abstract.** In the new world of medicine, one of the main concerns in the field of infectious diseases has been focused on Human T-cell Leukemia Virus type 1 (HTLV-1). During the infection, lymphocyte inhibitory receptors (LIRs) play a prominent role in the occurrence of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). These receptors include LAG3, PD-1, TIGIT, CD160, TIM3, and 2B4. First, we have collected all microarray information on the profile of HTLV-1 infected patients from the Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.gov/geo>) database until March 2020, in order to identify the microarray related to evolutionary development of LTRs during various phases of HTLV-1 infection in human peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cells by searching for keywords such as “Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-1)”, “Homo sapiens”, “ATLL”, and “Whole genome sequencing”. Considering the main goal of the study, we have only assessed data related to *Homo sapiens* particularly CD4<sup>+</sup> T cell lineage from human subjects infected with HTLV-1. We evaluated these receptors in ATLL patients compared to healthy control (HC) individuals and HTLV-1 infected-asymptomatic carriers (ASCs). Out of all 18 identified records, we only selected and analyzed three studies: GSE19080, GSE33615, and GSE57259, which satisfied inclusion criteria with proper quality analysis of ATLL vs. normal, ATLL vs. asymptomatic carrier as well as asymptomatic carrier vs. normal. Unfortunately, we could not analyze various stages of ATLL malignancy (acute, lymphomatous, chronic and smoldering) in all included studies due to the lack of sufficient information. Finally, based on Benjamini–Hochberg False discovery rate (FDR), the differentially expressed genes (DEGs) were selected for several categories. Hence, for the first time we demonstrated that the expression rate of LIRs in ATLL group was higher than either in asymptomatic carrier or healthy donor groups. As a conclusion, it seems that the blockade of LIRs has a pivotal role in diagnostics and treatment of ATLL malignancy.

**Key words:** ATLL, HAM/TSP, HTLV-1, LIRs, malignancy, immunity.

## БЛОКАДА LIRs КАК НОВЫЙ ПОДХОД К ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ Т-КЛЕТОЧНОГО ЛЕЙКОЗА ВЗРОСЛЫХ

Кейха М.<sup>1</sup>, Карбалаеи М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Мешхедский университет медицинских наук, г. Мешхед, Иран

<sup>2</sup> Исламский университет Азад, филиал Тонкабон, г. Тонкабон, Иран

**Резюме.** В современной медицине одной из основных проблем в области инфекционных заболеваний является вирус Т-клеточного лейкоза человека 1 типа (HTLV-1). Важную роль в возникновении Т-клеточного лейкоза/лимфомы взрослых (ATLL) на фоне HTLV-1-инфекции играют лимфоцит-ингибирующие рецепторы (LIR). К LIR относятся LAG3, PD-1, TIGIT, CD160, TIM3 и 2B4. Для проведения исследования из базы данных Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.gov/geo>) по таким ключевым словам, как «Т-лимфотропный вирус человека типа I (HTLV-1)», «Homo sapiens», «ATLL» и «полногеномное секвенирование», была собра-

---

### Адрес для переписки:

Мохсен Карбалаеи  
Иран, г. Джирофт, Университет медицинских наук Джирофта.  
Тел.: +98 913 193-36-12.  
E-mail: mohsen.karbalaeei@jmu.ac.ir

### Contacts:

Mohsen Karbalaeei  
Iran, Jiroft, Jiroft University of Medical Sciences.  
Phone: +98 913 193-36-12.  
E-mail: mohsen.karbalaeei@jmu.ac.ir

### Для цитирования:

Кейха М., Карбалаеи М. Блокада LIRs как новый подход к диагностике и лечению Т-клеточного лейкоза взрослых // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1185–1189. doi: 10.15789/2220-7619-BOL-1635

### Citation:

Keikha M., Karbalaeei M. Blockade of LIRs as a new approach for diagnostics and treatment of ATLL malignancy // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1185–1189. doi: 10.15789/2220-7619-BOL-1635

на вся информация о результатах детекции LIR в CD4<sup>+</sup> Т-клетках периферической крови пациентов, инфицированных HTLV-1, с помощью технологии микрочипов для изучения эволюции LIR на разных стадиях HTLV-1-инфекции. Поиск был ограничен мартом 2020 г. Принимая во внимание главную цель исследования, мы провели оценку данных, относящихся к *Homo sapiens*, в частности к линии CD4<sup>+</sup> Т-клеток людей, инфицированных HTLV-1. Мы изучали эти рецепторы у пациентов с ATLL в сравнении со здоровыми людьми из контрольной группы (КГ) и у бессимптомных носителей HTLV-1. Из всех 18 обнаруженных исследований мы выбрали и проанализировали только три работы: GSE19080, GSE33615 и GSE57259, которые удовлетворяли критериям включения с надлежащим качественным анализом ATLL по сравнению с контролем, ATLL по сравнению с бессимптомным носительством, а также бессимптомное носительство по сравнению с контролем. К сожалению, мы не смогли проанализировать различные стадии ATLL (острая, лимфоматозная, хроническая и медленная) во всех включенных исследованиях из-за отсутствия достаточной информации. Наконец, на основе коэффициента ложного обнаружения Бенджамини–Хохберга (FDR) для нескольких категорий были отобраны дифференциально экспрессируемые гены (DEG). Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что уровень экспрессии LIR в группе ATLL был выше, чем в группе бессимптомных носителей или здоровых доноров. В заключение следует отметить, что, по нашим предположениям, блокада LIR играет ключевую роль в диагностике и лечении злокачественных новообразований ATLL.

**Ключевые слова:** ATLL, HAM/TSP, HTLV-1, LIRs, злокачественность, иммунитет.

## Introduction

In recent years, it has been demonstrated that high expression of inhibitor receptors on lymphocytes leads to modulation of function of co-stimulatory receptors and finally decreased T cell activity, tissue damage, and autoimmunity [1, 33]. According to *in vitro* evidence, about 24 h after stimulation of lymphocytes, lymphocyte inhibitory receptors (LIRs) begin to express and reach to their highest levels after 48 h [31]. Hence, it seems that long stimulation of lymphocytes increases the expression of LIRs genes, which in turn leads to the T cells dysfunction, and finally cancer [26, 33]. Based on recent studies, chronic inflammation by viral infection can cause excessive expression of LIRs and as a result down-regulation of lymphocyte proliferation and dysregulation of cytokine release [30]. Like hepatitis C virus, Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is one of the most important single-stranded RNA viruses [2, 12]. Once it enters human circulatory system, HTLV-1 creates persistent infection and chronic inflammation through inhibition and escape mechanisms from facing immune responses. Therefore, it is likely that the activity of LIRs can have a positive impact on pathogenesis of HTLV-1 virus with clinical symptoms [14, 17]. This oncogenic virus belongs to *Retroviridae* family which has infected about 15–20 million people worldwide [15]. Although most infected individuals remain asymptomatic, 2–6% of them progress to adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), and 2–3% to HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) [10, 13, 15]. ATLL is one of the most severe types of leukemia in which CD4<sup>+</sup> T cells increase dramatically [28]. Although the pathogenesis of ATLL is still unknown, its most well-known features include immortalization of the infected CD4<sup>+</sup> T cells, continuous lymphocyte proliferation, CD4<sup>+</sup> T cell exhaustion and the increase in the number of regulatory (Treg) T cells of TGF- $\beta$  and IL-10 cytokines [7, 11]. However, LIRs play

an important role in the development of ATLL [9]. The aim of this study was to investigate the differences of expression of LIRs genes such as LAG3, PD-1, TIGIT, CD160, TIM3, and 2B4 in ATLL patients compared to healthy control (HC) individuals and HTLV-1 infected-asymptomatic carriers (ASCs).

## Methods

First, we have collected all microarray information on the profile of HTLV-1 infected patients from Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.gov/geo>) database till the end of March 2020, in order to identify the microarray related to evolutionary development of lymphocyte inhibitory receptor genes during various phases of HTLV-1 infection in CD4<sup>+</sup> T cells of human subjects. The keywords such as “Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-1)”, “*Homo sapiens*”, “ATLL”, and “Whole genome sequencing” were being used repeatedly. Considering the main goal of the study, we have only assessed data related to *Homo sapiens* particularly CD4<sup>+</sup> T cell line of human subjects infected with HTLV-1. Quality and consistency of data was done using R package MetaQC. In the next step, both differentially expressed genes (DEGs) and Logarithm fold-change (logFC) were measured for several different categories such as: 1) ATLL vs. HC individuals; 2) ATLL vs. ASCs; 3) ASCs vs. HC individuals; 4) combination of various subtypes of ATLL by GEO2R; DEGs were selected according to Benjamini–Hochberg False discovery rate (FDR) with p value < 0.05. The positive logFC represents upregulation, whereas negative logFC represents downregulation. The lymphocyte inhibitory receptor genes were selected by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways, one of the best Enricher web tools based on the top combined scores. In addition, the super-network comprises protein interaction network between LIRs which was constructed by STRING online database version 10.5. Also, the heatmap plots were generated

using Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>) [8]. In the final step, we have proposed the signaling network in relation to potential role of the lymphocyte inhibitory receptor genes during pathogenesis of HTLV-1 infection.

## Results and discussion

From total of 18 identified records, we only selected and analyzed three studies: GSE19080 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE19080>), GSE33615 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE33615>), and GSE57259 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE57259>); they all met our inclusion criteria with proper quality analysis of ATLL vs. normal, ATLL vs. asymptomatic carrier as well as asymptomatic carrier vs. normal. Unfortunately, we could not analyze various stages of ATLL malignancy (acute, lymphomatous, chronic and smoldering) in all included studies due to lack of information. Overall, the expression rate of LIRs in ATLL group was higher than either of asymptomatic carrier and healthy donor groups (Fig. 1, III cover).

It is notable that the expression rate of LIRs was also higher in ASCs in comparison with HC donors (Table). Among all, the analysis of GSE33615 study showed that expression of LIRs in particular PD-1 and LAG3 genes was significantly related to severity of the disease ( $p$  value < 0.001). In addition, ADAM10/17 gene is coded a transmembrane metalloprotease which is cleavage LAG 3 which is downregulated in precancerous phase (Table).

According to STRING network, a close relationship was observed among interfering genes in lymphocyte inhibitory process (Fig. 2, III cover). The PPIN networks consist of 11 nodes and 35 edges; the distance between each nodes represents a close contribution and cooperative functions of each node as well as the color of the edges which is responsible for type of each experiments which confirmed relationship between each node.

According to KEGG and wikiPathway databases in relation to the effects of the lymphocyte inhibitory receptor genes and their alternation in normal

signaling pathway during HTLV-1 infection, constant stimulation and continuous expression of LIRs on HTLV-1 infected CD4<sup>+</sup> T cells could cause: 1) apoptosis of HTLV-1 specific CD8<sup>+</sup> T cells; 2) anergy; 3) expression of immune suppressor cytokines e.g. IL-10 and TGF- $\beta$ ; 4) support of Treg cells; 5) cell-proliferation and 6) HTLV-1 infected T cells develop into ATLL malignancy (Fig. 3, III cover).

Based on the results obtained in the present study, we demonstrated a significant increase in the expression of genes associated with lymphocyte inhibitory effect and their relationship with severity of the disease, in particular PD-1 and LAG3 genes in patients affected by ATLL. Some alterations such as cell proliferation, T cell exhaustion, and immune dysregulation are among the main factors related to the occurrence of HTLV-1 infected CD4<sup>+</sup> T cells [24]. Recently, studies have shown that the number of T cells (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) which express PD-1, would increase in ATLL patients [19, 29]. Either of two HBZ and Tax proteins of HTLV-1 virus can increase the expression of IL-10 by HTLV-1 infected CD4<sup>+</sup> T cells. Also, the induction of Treg cells function in infected patients leads to the enhancement of IL-10, TGF- $\beta$ , and secretion of epidermal growth factor (EGF), these changes could cause continuous proliferation and immortalization of HTLV-1 infected T cells, and are considered as risk factors for ATLL [7, 16, 23, 24]. There is a dysregulation of function of LIRs expressing T cells which have been infected by HTLV-1; for example, Ouaguia et al. (2014) showed that the number of Treg type 1 (Tr1) cells which produce cytokines such as IL-10, TGF- $\beta$ , CD18 and LAG3 increases in patients affected by ATLL [23]. Konnai et al. (2013) in their study on bovine leukemia virus (BLV), discovered that the expression of LAG3 increases on the surface of lymphocytes of bovis affected by leukemia [24]. In 2016, Yasuma et al. illustrated that HTLV-1 bZIP factor inhibits the cytotoxicity function of T CD8<sup>+</sup> cells via induction of T-Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT) [32]. Ndhlovu et al. (2011) by monitoring the HAM/TSP patients, discovered that HTLV-1 tax specific CD8<sup>+</sup> T cells decreases the expression of TIM3 receptor. They also realized that some unknown factors, through their non-inhibitory effects

**Table. LogFC of ATLL vs ASCs or HC, as well as ATLL subtypes**

GEO studies	Population setting	LAG3	PD1	ADAM10/17	TIGIT	CD160	TIM3	2B4
GSE19080	ATLL vs. ASCs	0.78	0.80	NA	NA	0.11	NA	0.18
	ASCs vs. HC	0.55	0.29	NA	NA	0.16	NA	0.42
	ATLL vs. HC	0.48	1.2	NA	NA	0.47	NA	0.61
GSE57259	ATLL vs. HC	2.47	2.79	-0.97	NA	3.19	0.06	0.31
GSE33615	ATLL vs. HC	2.13	-0.65	0.45	1.13	0.31	1.29	1.39
	Acute vs. Chronic	0.29	0.03	-0.59	-0.20	-0.71	0.43	-0.45
	Acute vs. Smoldering	2.51	1.30	0.89	2.65	-1.01	0.54	0.84
	Chronic vs. Smoldering	2.69	1.39	1.50	2.73	-0.23	-0.11	1.27
	Lymphomatous vs. other types	0.36	2.48	-0.54	-1.50	-1.21	-1.69	-0.44

**Note.** LogFC — logarithm fold-change, ASCs — infected-asymptomatic carriers, HC — healthy control.

on exaggerative responses in immune system, could develop chronic progressive inflammation status [25]. In 2014, Chibueze et al. demonstrated that the expression of CD160 molecule on HTLV-1 specific CD8<sup>+</sup> T cells will have an inhibitory effect on their function, and must be considered as a risk factor in developing the infection into ATLL [4]. In another related study, Ezinne et al. (2014) declared that blocking 2B4/CD48 interaction can increase functional capacity of the infected CD<sup>+</sup> T cells (Fig. 3, III cover) [5].

In recent years, various studies have focused on the impact of LIRs blocking drugs for treating ATLL malignancy. For example, Pembrolizumab, which is a monoclonal antibody against PD-1, has successfully passed phase II of clinical trial among T cell-lymphoma patients [3]. Relatlimab (CA224-060), as an anti-LAG3 has passed phase II of clinical trial [6]. Another Relatlimab (1302TiP CA224-047) in combination with Nivolumab (anti-PD-1) is in phase II/III of the study [21]. Sym023, a human anti-TIM3, is a well-known antibody which inhibits TIM3 *in vitro* [20]. TSR-022, is a potent anti-human TIM-3 therapeutic antibody. Anti-CD160, alone or in combination with Bevacizumab, is considered as an inhibitor of ocular neovascularization in rabbit and monkey models [22]. Hence, it seems that block-

ing LIRs through supporting cytotoxicity of CD8<sup>+</sup> T cells can be considered as an important strategy in containment and treatment of lymphoma, particularly in ATLL patients [13].

## Conclusion

In summary, in the present study, we first showed that LIRs such as LAG3, PD-1, TIGIT, TIM3, CD160 and 2B4 were overexpressed in ATLL patients compared to asymptomatic carriers and healthy individuals. Hence, LIRs are considered as a significant biomarker in development of the infection to ATLL. On the other hand, LIRs blocking drugs can be used as the best candidates for treatment of ATLL malignancy. As noted before, several anti-LIRs are being used in both human and animal cases, including Pembrolizumab and Nivolumab (anti-PD-1), Relatlimab (anti-LAG3), Sym023 and TSR-022 (anti-TIM-3), and monoclonal antibodies against CD160, TIGIT, and 2B4.

## Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

- Andrews L.P., Marciscano A.E., Drake C.G., Vignali D.A. LAG 3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immun. Rev.*, 2017, vol. 276, no. 1, pp. 80–96. doi: 10.1111/immr.12519
- Bangham C.R. Human T cell leukemia virus type 1: persistence and pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2018, vol. 36, pp. 43–71. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053222
- Barta S.K., Zain J., MacFarlane A.W. 4<sup>th</sup>, Smith S.M., Ruan J., Fung H.C., Tan C.R., Yang Y., Alpaugh R.K., Dulaimi E., Ross E.A., Campbell K.S., Khan N., Siddharta R., Fowler N.H., Fisher R.I., Oki Y. Phase II study of the PD-1 inhibitor pembrolizumab for the treatment of relapsed or refractory mature T-cell lymphoma. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, 2019, vol. 19, no. 6, pp. 356–364.e3. doi: 10.1016/j.clml.2019.03.022
- Chibueze C.E., Yoshimitsu M., Arima N. CD160 expression defines a uniquely exhausted subset of T lymphocytes in HTLV-1 infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2014, vol. 453, no. 3, pp. 379–384. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.084
- Ezinne C.C., Yoshimitsu M., White Y., Arima N. HTLV-1 specific CD8<sup>+</sup> T cell function augmented by blockade of 2B4/CD48 interaction in HTLV-1 infection. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 2: e87631. doi: 10.1371/journal.pone.0087631
- Feeney K., Kelly R., Lipton L.R., Chao J., Acosta-Rivera M., Earle D., Lei M., Kollia G., Tebbutt N.C. CA224-060: a randomized, open label, phase II trial of relatlimab (anti-LAG-3) and nivolumab with chemotherapy versus nivolumab with chemotherapy as first-line treatment in patients with gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. *Am. J. Clin. Oncol.*, 2019, vol. 37, no. 15: TPS4143. doi: 10.1200/JCO.2019.37.15\_suppl.TPS4143
- Futsch N., Prates G., Mahieux R., Casseb J., Dutartre H. Cytokine networks dysregulation during HTLV-1 infection and associated diseases. *Viruses*, 2018, vol. 10, no. 12: 691. doi: 10.3390/v10120691
- Ghazvini K., Yousefi M., Keikha M. Expression changes of cytotoxicity and apoptosis genes in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients from the perspective of system virology. *Access Microbiol.*, 2020, vol. 2, no. 3: acmi000088. doi: 10.1099/acmi.0.000088
- Hude I., Sasse S., Engert A., Bröckelmann P.J. The emerging role of immune checkpoint inhibition in malignant lymphoma. *Haematologica*, 2017, vol. 102, no. 1, pp. 30–42. doi: 10.3324/haematol.2016.150656
- Karbalaei M., Keikha M. Curcumin as an herbal inhibitor candidate against HTLV-1 protease. *Jentashapir J. Health Res.*, 2019, vol. 10, no. 1: e92813. doi: 10.5812/jjhr.92813
- Karbalaei M., Keikha M. What is adult T-cell leukemia pathogenesis? System virology as a solution of this puzzle. *Jundishapur J. Chronic. Dis. Care*, 2019, vol. 8, no. 3: e93351. doi: 10.5812/jjcdc.93351
- Keikha M., Eslami M., Yousefi B., Ali-Hassanzadeh M., Kamali A., Yousefi M., Karbalaei M. HCV genotypes and their determinative role in hepatitis C treatment. *VirusDisease*, 2020, vol. 31, no. 3, pp. 235–240. doi: 10.1007/s13337-020-00592-0
- Keikha M., Ghazvini K., Eslami M., Yousefi B., Casseb J., Yousefi M., Karbalaei M. Molecular targeting of PD-1 signaling pathway as a novel therapeutic approach in HTLV-1 infection. *Microb. Pathog.*, 2020, vol. 144: 104198. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104198
- Keikha M., Karbalaei M. Overview on coinfection of HTLV-1 and tuberculosis: mini-review. *J. Clin. Tuberc. Other Mycobact. Dis.*, 2021, vol. 23: 100224. doi: 10.1016/j.jctube.2021.100224

15. Keikha M., Karbalaei Zadeh Babaki M., Marcondes Fonseca L.A., Casseb J. The relevance of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Iran: a review study. *Rev. Clin. Med.*, 2019, vol. 6, no. 2, pp. 60–65. doi: 10.22038/RCM.2019.38759.1266
16. Kinoshita H., Yasunaga J.I., Shimura K., Miyazato P., Onishi C., Iyoda T., Inaba K., Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor enhances T-cell proliferation by impeding the suppressive signaling of co-inhibitory receptors. *PLoS Pathog.*, 2017, vol. 13, no. 1: e1006120. doi: 10.1371/journal.ppat.1006120
17. Kinoshita H., Yasunaga J.-I., Shimura K., Matsuoka M. Functional impairment of co-inhibitory receptors promotes T-cell proliferation in HTLV-1 associated adult T-cell leukemia cells. *Blood*, 2016, vol. 128, no. 22, p. 2516. doi: 10.1182/blood.V128.22.2516.2516
18. Konnai S., Suzuki S., Shirai T., Ikebuchi R., Okagawa T., Sunden Y., Mingala C.N., Onuma M., Murata S., Ohashi K. Enhanced expression of LAG-3 on lymphocyte subpopulations from persistently lymphocytotic cattle infected with bovine leukemia virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013, vol. 36, no. 1, pp. 63–69. doi: 10.1016/j.cimid.2012.09.005
19. Kozako T., Yoshimitsu M., Fujiwara H., Masamoto I., Horai S., White Y., Akimoto M., Suzuki S., Matsushita K., Uozumi K., Tei C., Arima N. PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia*, 2009, vol. 23, no. 2, pp. 375–382. doi: 10.1038/leu.2008.272
20. Lindsted T., Gad M., Grandal M.V., Frölich C., Bhatia V.K., Gjetting T., Lantto J., Horak I.D., Kragh M., Koefoed K., Pedersen M.W. Preclinical characterization of Sym023 a human anti-TIM3 antibody with a novel mechanism of action. *AACR*, 2018, vol. 78, no. 13: 5629. doi: 10.1158/1538-7445.AM2018-5629
21. Lipson E.J., Long G.V., Tawbi H., Schadendorf D., Atkinson V.G., Maurer M., Simonsen K.L., Harbison C., Hodi F.S. CA224-047: a randomized, double-blind, phase II/III study of relatlimab (anti-LAG-3) in combination with nivolumab (anti-PD-1) versus nivolumab alone in previously untreated metastatic or unresectable melanoma. *Ann. Oncol.*, 2018, vol. 29, no. 8, pp. viii464–viii465. doi: 10.1093/annonc/mdy289.058
22. Menguy T., Briaux A., Jeunesse E., Giustiniani J., Calcei A., Guyon T., Mizrahi J., Haegel H., Duong V., Soler V., Brousset P., Bensussan A., Raymond Letron I., Le Bouteiller P. Anti-CD160, alone or in combination with bevacizumab, is a potent inhibitor of ocular neovascularization in rabbit and monkey. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2018, vol. 59, no. 7, pp. 2687–2698. doi: 10.1167/iovs.18-24024
23. Mori N., Gill P.S., Mougdil T., Murakami S., Eto S., Prager D. Interleukin-10 gene expression in adult T-cell leukemia. *Blood*, 1996, vol. 88, no. 3, pp. 1035–1045.
24. Mozhgani S.H., Zarei-Ghobadi M., Teymoori-Rad M., Mokhtari-Azad T., Mirzaie M., Sheikhi M., Jazayeri S.M., Shahbahrami R., Ghourchian H., Jafari M., Rezaee S.A., Norouzi M. Human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) pathogenesis: a systems virology study. *J. Cell Biochem.*, 2018, vol. 119, no. 5, pp. 3968–3979. doi: 10.1002/jcb.26546
25. Ndhlovu L.C., Leal F.E., Hasenkrug A.M., Jha A.R., Carvalho K.I., Eccles-James I.G., Bruno F.R., Vieira R.G., York V.A., Chew G.M., Jones R.B., Tanaka Y., Neto W.K., Sanabani S.S., Ostrowski M.A., Segurado A.C., Nixon D.F., Kallas E.G. HTLV-1 tax specific CD8<sup>+</sup> T cells express low levels of Tim-3 in HTLV-1 infection: implications for progression to neurological complications. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2011, vol. 5, no. 4: e1030. doi: 10.1371/journal.pntd.001030
26. Odorizzi P.M., Wherry E.J. Inhibitory receptors on lymphocytes: insights from infections. *J. Immunol.*, 2012, vol. 188, no. 7, pp. 2957–2965. doi: 10.4049/jimmunol.1100038
27. Ouaguia L., Mrizak D., Renaud S., Moralès O., Delhem N. Control of the inflammatory response mechanisms mediated by natural and induced regulatory T-cells in HCV-, HTLV-1-, and EBV-associated cancers. *Mediators Inflamm.*, 2014: 564296. doi: 10.1155/2014/564296
28. Rodríguez-Zúñiga M., Cortez-Franco F., Qujiano-Gomero E. Adult T-cell leukemia/lymphoma. *Actas Dermosifiliogr. (Engl. Ed.)*, 2018, vol. 109, no. 5, pp. 399–407. doi: 10.1016/j.ad.2017.08.014
29. Shimauchi T., Kabashima K., Nakashima D., Sugita K., Yamada Y., Hino R., Tokura Y. Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4<sup>+</sup> T-cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Cancer*, 2007, vol. 121, no. 12, pp. 2585–2590. doi: 10.1002/ijc.23042
30. Virgin H.W., Wherry E.J., Ahmed R. Redefining chronic viral infection. *Cell*, 2009, vol. 138, no. 1, pp. 30–50. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.036
31. Workman C.J., Rice D.S., Dugger K.J., Kurschner C., Vignali D.A. Phenotypic analysis of the murine CD4 related glycoprotein, CD223 (LAG-3). *Eur. J. Immunol.*, 2002, vol. 32, no. 8, pp. 2255–2263. doi: 10.1002/1521-4141(200208)32:8<2255::AID-IMMU2255>3.0.CO;2-A
32. Yasuma K., Yasunaga J.-I., Takemoto K., Sugata K., Mitobe Y., Takenouchi N., Nakagawa M., Suzuki Y., Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs anti-viral immunity by inducing co-inhibitory molecule, T cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT). *PLoS Pathog.*, 2016, vol. 12, no. 1: e1005372. doi: 10.1371/journal.ppat.1005372
33. Zarour H.M. Reversing T-cell dysfunction and exhaustion in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2016, vol. 22, no. 8, pp. 1856–1864. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1849

**Авторы:**

**Кеиха М.**, к.н., кафедра микробиологии и вирусологии медицинского факультета, Мешхедский университет медицинских наук, г. Мешхед, Иран;  
**Карбалаеи М.**, к.н., кафедра микробиологии и вирусологии медицинской школы, Университет медицинских наук Джирофта, г. Джирофт, Иран.

**Authors:**

**Keikha M.**, PhD, Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Mashhad University Medical Sciences, Mashhad, Iran;  
**Karbalaei M.**, PhD, Department of Microbiology and Virology, School of Medicine, Jiroft University of Medical Sciences, Jiroft, Iran.

Поступила в редакцию 10.11.2020  
 Отправлена на доработку 28.03.2021  
 Принята к печати 10.04.2021

Received 10.11.2020  
 Revision received 28.03.2021  
 Accepted 10.04.2021

# ТРАЕКТОРИЯ ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ЗДОРОВЫХ ЛИЦ В КОНТЕКСТЕ МЕТАОРГАНИЗМА

Ю.Ю. Филиппова, М.Е. Холодилина, А.Л. Бурмистрова

ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия

**Резюме.** Изучение микробиоты тонкого кишечника у человека затруднено в связи с малой доступностью биоматериала. Применение неинвазивных методов метаболомики и биоинформационного анализа данных может расширить наши представления о структуре микробиоты тонкого кишечника и ее роли в поддержании гомеостаза организма. Цель исследования — с помощью методов газовой хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров (ГХМС ММ) и оптимального шкалирования оценить траекторию возрастных изменений микробного сообщества тонкого кишечника у здоровых лиц в контексте взаимодействия с цитокиновой и нейроэндокринной системами в рамках метаорганизма. В исследование включены 110 практически здоровых индивидуумов детского, репродуктивного и пожилого/старческого возраста. Численность представителей основных типов микробиоты тонкого кишечника (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Fusobacteria*) определяли методом ГХМС ММ в периферической крови. Для построения траекторий изменения сообщества микробиоты тонкого кишечника и показателей цитокиновой и нейроэндокринной систем с возрастом применяли технику оптимального шкалирования, основанную на многомерном преобразовании Джифи (метод САТРСА [Categorical Principal Components Analysis]). Установлено, что для бактериального сообщества тонкого кишечника детей и пожилых лиц была характерна значимо низкая общая численность микроорганизмов за счет низкого количества бактерий типов *Firmicutes* и *Actinobacteria* на фоне высокого числа представителей типов *Proteobacteria* и *Fusobacteria* по сравнению с аналогичными показателями в репродуктивном возрасте. Оценка траектории возраст-ассоциированных изменений микробиоты тонкого кишечника показала 1) наличие сильных динамических колебаний численности и связей внутри сообщества микроорганизмов на фоне формирования связей между основными регуляторными системами метаорганизма — иммунной и нейроэндокринной — в детском возрасте; 2) пластичность и согласованность функционирования иммунной и нервной систем, определяющие состояние динамического равновесия микробиоты тонкого кишечника у людей репродуктивного возраста; 3) максимальную степень кооперации между основными членами бактериального сообщества, обеспечивающую стабильность системы на новом уровне, как один из механизмов адаптации организма при здоровом старении. Таким образом, использование методов ГХМС ММ и оптимального шкалирования позволяет расширить наши представления о возраст-ассоциированной траектории изменений микробиоты тонкого кишечника и ее кооперации с иммунной и нейроэндокринной системами в рамках метаорганизма, что может быть использовано в разработке новых способов терапии заболеваний инфекционной и неинфекционной природы.

**Ключевые слова:** микробиота тонкого кишечника, цитокины, нейрогормоны, газовая хромато-масс-спектрометрия микробных маркеров, дети, пожилые люди, люди репродуктивного возраста.

---

**Адрес для переписки:**

Филиппова Юлия Юрьевна  
454001, Россия, г. Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129,  
ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет.  
Тел.: 8 912 404-52-72.  
E-mail: julse@rambler.ru

**Contacts:**

Yuliya Yu. Filippova  
454001, Russian Federation, Chelyabinsk,  
Bratiev Kashirinykh str., 129, Chelyabinsk State University.  
Phone: +7 912 404-52-72.  
E-mail: julse@rambler.ru

**Для цитирования:**

Филиппова Ю.Ю., Холодилина М.Е., Бурмистрова А.Л. Траектория возраст-ассоциированных изменений микробного сообщества тонкого кишечника здоровых лиц в контексте метаорганизма // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1190–1196. doi: 10.15789/2220-7619-TOA-1624

**Citation:**

Filippova Yu.Yu., Kholodilina M.E., Burmistrova A.L. Trajectory of age-associated changes in small intestinal microbial community of healthy person metaorganism // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1190–1196. doi: 10.15789/2220-7619-TOA-1624

## TRAJECTORY OF AGE-ASSOCIATED CHANGES IN SMALL INTESTINAL MICROBIAL COMMUNITY OF HEALTHY PERSON METAORGANISM

Filippova Yu.Yu., Kholodilina M.E., Burmistrova A.L.

*Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation*

**Abstract.** The study of the small intestinal microbiota in humans is complicated due to the low availability of biomaterial. Non-invasive methods of metabolomics and bioinformatic data analysis can expand our understanding of the small intestinal microbiota structure and its role in maintaining body homeostasis. Here we assess the trajectory of age-related changes in the small intestinal microbial community of healthy individuals in the context of metaorganism-wide interaction between cytokine and neuroendocrine systems, by using the methods of gas chromatography mass spectrometry of microbial markers (GCMS MM) and optimal scaling. 110 apparently healthy children, adults and elderly individuals were enrolled to the study. The main types of the small intestine microbiota (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Fusobacteria*) were quantified in peripheral blood by the GCMS MM method. To construct age-related trajectories of changes in the small intestinal microbiota and parameters of cytokine and neuroendocrine systems, the optimal scaling technique based on the multivariate Gifi transformation (CATPCA method) was used. It was found, that the small intestinal bacterial community of both children and seniors contained significantly lowered total number of microorganisms due to the low number of bacteria of *Firmicutes* and *Actinobacteria* types along with high number of members of *Proteobacteria* and *Fusobacteria* types compared with adults. Assessment of the trajectory of age-associated changes in microbiota of the small intestine showed that 1) children have strong dynamic fluctuations in the number and links within microbial community along with formation of links between the main regulatory immune and neuroendocrine systems of the metaorganism, 2) adults display plasticity and consistency in functioning of immune and nervous systems that determine the state of dynamic balance of the small intestinal microbiota, 3) healthy aging is characterized by high degree of cooperation between the main members of the bacterial community, which ensures system stability at new level, as one of the mechanisms of host adaptation. Thus, using methods of GCMS MM and optimal scaling, allows us to expand our understanding about age-associated trajectory of changes in the small intestinal microbiota and its cooperation with immune and neuroendocrine systems within the metaorganism, which can be used to develop new methods of therapy for infectious and non-infectious diseases.

**Key words:** *small intestine microbiota, cytokines, neurohormones, gas chromatography mass spectrometry of microbial markers, children, the elderly, adult people.*

Согласно современным данным, человек представляет собой метаорганизм — сложную систему, состоящую из множества эукариотических клеток и симбиотических сообществ микроорганизмов, включающих бактерии, грибы, археи, вирусы и простейшие [9, 17]. У взрослого человека количество бактериальных клеток примерно в 10 раз превышает число его собственных, при этом большая их часть (около 70%) находится в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) [3]. Кишечная микробиота играет ключевую роль в поддержании общего гомеостаза организма и здоровья человека, выполняя ряд важных функций: она участвует в морфогенезе органов, в том числе нервной системы, метаболизме и старении, обеспечивает защиту от патогенов, колонизационную резистентность и созревание иммунной системы [1, 13, 17]. В свою очередь, организм хозяина формирует микробиом ЖКТ за счет выбора диеты и образа жизни, а также за счет нервной и иммунной регуляции. В настоящее время дисбаланс гомеостатических взаимодействий организма хозяина и микробиома связывают с патогенезом заболеваний как инфекционной, так и неинфекционной природы, включая воспалительные заболевания кишечника, диабет, ожирение, рак, тревогу и депрессию [5, 13].

Применение методов секвенирования и «омиксных» технологий» (геномики, протеомики, метаболомики) привело к значительному прогрессу в представлении о таксономических и функциональных характеристиках микробиоты толстого кишечника, а также о ее становлении и развитии на протяжении жизни метаорганизма в норме и при патологии [19]. В то же время структура и функции микробиоты тонкого кишечника человека остаются малоизученными, что связано, прежде всего, с необходимостью использования инвазивных методов отбора проб: эзофагогастродуоденоскопии, колоноскопии, илеостомии и др. [16], хотя хорошо известно, что микробиота тонкого кишечника оказывает значительное влияние на различные аспекты физиологии метаорганизма, включая метаболическую (отвечает за всасывание примерно 90% общей энергии из пищи), иммунную и эндокринную функции [12]. Исследования на животных моделях гнотобиотических и традиционных мышей вносят значительный вклад в изучение роли микробиоты тонкого кишечника, но их отличия от людей с точки зрения размера кишечника, скорости метаболизма, диетических привычек и пространственно-временных микробных структур затрудняют экстраполяцию данных [16]. Поэтому поиск и при-

менение современных методов метаболомики и биоинформационного анализа может расширить наши представления о структуре и роли микробиоты тонкого кишечника в поддержании гомеостаза организма.

Цель исследования — с помощью методов газовой хроматографии — масс-спектрометрии микробных маркеров (ГХМС ММ) и оптимального шкалирования оценить траекторию возрастных изменений микробного сообщества тонкого кишечника у здоровых лиц в контексте взаимодействия с цитокиновой и нейроэндокринной системами в рамках метаорганизма.

## Материалы и методы

В кросс-секционное исследование были включены 110 практически здоровых индивидуумов трех возрастных групп. В первую группу («Дети») вошли 45 здоровых (типично развивающихся) детей (32 мальчика и 13 девочек) дошкольного и младшего школьного возраста от 4 до 13 лет (средний возраст — 9 лет). Вторую группу («Репродуктивный возраст») составили 25 потенциальных доноров костного мозга (16 мужчин и 9 женщин) ГБУЗ Челябинская областная станция переливания крови в возрасте от 21 до 49 лет (средний возраст — 36 лет). В третью группу («Здоровое старение») вошли 40 людей пожилого и старческого возраста (16 мужчин и 24 женщины) от 66 до 89 лет (средний возраст — 79 лет), постоянно проживавших в Челябинском геронтологическом центре. Люди пожилого и старческого возраста имели типичные возраст-ассоциированные заболевания вне стадии обострения. Критериями исключения пожилых людей из исследования были ожирение, онкологические заболевания, болезнь Паркинсона и Альцгеймера, неврологические заболевания. Исследование одобрено этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 1 от 16.05.2016). Участниками или их законными представителями подписано информированное согласие, разрешающее применение полученных результатов в научной работе.

Материалом для исследования служила венозная кровь. Определение численности представителей основных 5 типов микробиоты тонкого кишечника (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Fusobacteria*) проводили методом ГХМС ММ в периферической крови с помощью газового хромато-масс-спектрометра «Маэстро» (ООО «Интерлаб», Россия), как было описано ранее. 40 мкл крови подвергали кислоту метанолизу 1 ч при 80°C. Метилвые эфиры и диметилацетали жирных кислот и альдегидов крови двукратно экстрагировали 200 мкл гексана, высушивали и обрабатывали 15 мин при 80°C 20 мкл

N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамида для получения триметилсилильных эфиров оксикислот и стиролов. Полученную смесь эфиров хроматографически разделяли на капиллярной колонке HP-5ms (Agilent, США) при следующих условиях: начальная температура 130°C, выдержка при начальной температуре — 0,5 мин, нагрев температуры со скоростью 70°/мин до 320°C, выдержка при конечной температуре — 6 мин, режим селективных ионов, газ-носитель — гелий, поток 1,2 мл/мин в режиме без деления потока. В результате получали хроматограммы жирных кислот и других липидных продуктов клеточных стенок микробных сообществ тонкого кишечника, которые были соотнесены с соответствующим типом и количеством микроорганизмов с помощью программы, разработанной Осиповым Г.А. В качестве внутреннего стандарта использовали дейтерометилловый эфир тридекановой кислоты. Чувствительность метода составляет 10<sup>4</sup> КОЕ/мл [6].

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ SPSS for Windows (v.18.0, SPSS Inc.). Для построения траекторий изменения сообщества микробиоты тонкого кишечника и показателей цитокиновой и нейроэндокринной систем с возрастом применяли технику оптимального шкалирования, основанную на многомерном преобразовании Джифи (метод CATPCA [Categorical Principal Components Analysis]). При этом численность микроорганизмов тонкого кишечника, а также уровни цитокинов и нейрогормонов в плазме обрабатывали как количественные переменные с последующим ранжированием, возраст — как номинальную категорию. Далее проводили сопоставление исходных данных по возрасту с оцифрованными по Джифи значениями, что позволяло получить интегральный показатель для каждого возраста, способный выявлять нелинейность (динамические изменения) уровней исследуемых показателей и связей между ними. Для получения сглаженных кривых применяли интерполяцию сплайнами Акимы. Графические построения выполнены в программе KyPlot (v.5.0.3 KyensLab Inc.).

## Результаты и обсуждение

На первом этапе с помощью метода ГХМС ММ нами была проведена оценка численности основных пяти типов микробиоты тонкого кишечника в группах практически здоровых индивидуумов детского, репродуктивного и пожилого/старческого возраста (табл.).

Как видно из таблицы, у людей репродуктивного возраста общая численность бактерий тонкого кишечника была значимо высокой за счет увеличения числа представителей

**Таблица. Численность основных типов сообщества микробиоты тонкого кишечника детей, людей репродуктивного возраста и при здоровом старении**

Table. The number of the main phyla of the small intestinal microbial community in children, adults and healthy elders

Показатель Indicators	Дети Children (n = 45)	Репродуктивный возраст Adults (n = 25)	Здоровое старение Healthy elders (n = 40)
<b>Bacteroidetes, КОЕ/мл</b> <i>Bacteroidetes</i> , CFU/ml	2,2 × 10 <sup>6</sup> (2,0–2,5 × 10 <sup>6</sup> )	2,6 × 10 <sup>6</sup> (1,9–2,9 × 10 <sup>6</sup> )	2,3 × 10 <sup>6</sup> (1,3–3,9 × 10 <sup>6</sup> )
<b>Firmicutes, КОЕ/мл</b> <i>Firmicutes</i> , CFU/ml	1,4 × 10 <sup>9</sup> (1,2–1,6 × 10 <sup>9</sup> )	2,0 × 10 <sup>9*</sup> (1,7–2,2 × 10 <sup>9</sup> )	1,6 × 10 <sup>9**</sup> (1,4–1,9 × 10 <sup>9</sup> )
<b>Actinobacteria, КОЕ/мл</b> <i>Actinobacteria</i> , CFU/ml	5,1 × 10 <sup>8</sup> (4,6–6,3 × 10 <sup>8</sup> )	6,4 × 10 <sup>8*</sup> (5,7–8,7 × 10 <sup>8</sup> )	4,7 × 10 <sup>8**</sup> (4,1–5,7 × 10 <sup>8</sup> )
<b>Proteobacteria, КОЕ/мл</b> <i>Proteobacteria</i> , CFU/ml	3,7 × 10 <sup>6</sup> (3,0–4,7 × 10 <sup>6</sup> )	3,2 × 10 <sup>6**</sup> (1,3–3,8 × 10 <sup>6</sup> )	4,2 × 10 <sup>6**</sup> (3,6–5,2 × 10 <sup>6</sup> )
<b>Fusobacteria, КОЕ/мл</b> <i>Fusobacteria</i> , CFU/ml	2,0 × 10 <sup>5</sup> (1,0–2,0 × 10 <sup>5</sup> )	< 1 × 10 <sup>5*</sup> (0–0 × 10 <sup>5</sup> )	2,0 × 10 <sup>5**</sup> (0–3,0 × 10 <sup>5</sup> )
<b>Общая численность микроорганизмов, КОЕ/мл</b> Total number of microorganisms, CFU/ml	1,9 × 10 <sup>9</sup> (1,8–2,2 × 10 <sup>9</sup> )	2,7 × 10 <sup>9*</sup> (2,4–3,0 × 10 <sup>9</sup> )	2,0 × 10 <sup>9**</sup> (1,8–2,4 × 10 <sup>9</sup> )

**Примечание.** Данные представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона; \* — статистически значимые различия между показателями детей и людей репродуктивного и пожилого возраста ( $p \leq 0,05$ ); \*\* — статистически значимые различия между показателями людей репродуктивного и пожилого возраста ( $p \leq 0,05$ ).

Note. Data are presented as medians and interquartile range; \* — significant differences between parameters in children and adults as well as healthy elders ( $p \leq 0.05$ ); \*\* — significant differences between parameters in adults and healthy elders ( $p \leq 0.05$ ).

типов *Firmicutes* и *Actinobacteria* по сравнению с аналогичными показателями в группе детей. Однако количество микроорганизмов типов *Proteobacteria* и *Fusobacteria*, наоборот, было значимо снижено в репродуктивном возрасте. Выявлены следующие особенности микробиоты тонкого кишечника при здоровом старении: значимое сокращение общей численности микроорганизмов и изменение структуры сообщества — снижение количества представителей типов *Firmicutes* и *Actinobacteria* и повышение числа бактерий типов *Proteobacteria* и *Fusobacteria* по сравнению с данными показателями людей репродуктивного возраста (табл. 1). Интересно отметить, что численность основных типов микроорганизмов в тонком кишечнике в старости не отличалась от таковой в детском возрасте (табл. 1). Полученные нами данные показывают, что значения и соотношение основных типов микроорганизмов тонкого кишечника претерпевают значительные изменения с возрастом. Так же как и для фекального микробиома, для микробиоты тонкого кишечника характерны низкая численность и разнообразие в детстве, которые повышаются по мере взросления организма. При здоровом старении по сравнению с репродуктивным возрастом происходит снижение общего количества микроорганизмов, а также повышение числа патобионтов из представителей типов *Proteobacteria* и *Fusobacteria* [18].

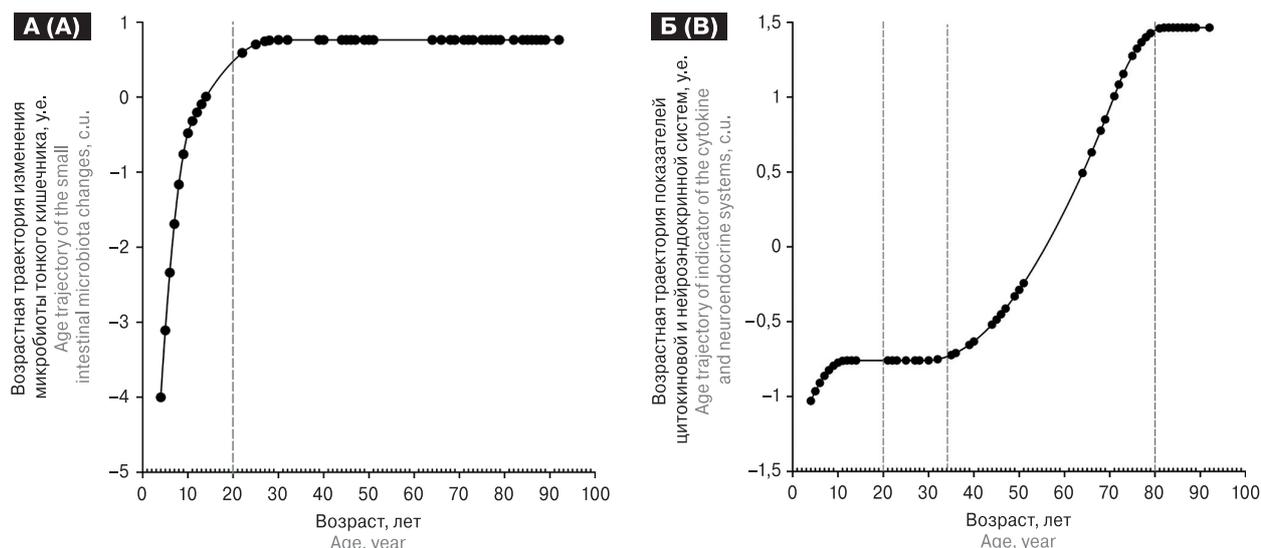
На втором этапе работы с помощью метода оптимального шкалирования мы попытались

создать интегральный показатель (включающий в себя значения численности исследуемых типов микроорганизмов и корреляционные связи между ними), который, с определенной долей допущения, может отражать динамические изменения/стабильность микробного сообщества тонкого кишечника в течение жизни метаорганизма.

В результате анализа были выделены 5 паттернов взаимосвязанных показателей, определяющих всю (100%) внутри- и межгрупповую изменчивость бактериального сообщества, на основе которых получено значение интегрального показателя для каждого возраста и построена возраст-ассоциированная траектория его изменения (рис., А).

Как видно из рис. А, кривая (функция) значений интегрального показателя микробиоты тонкого кишечника резко возрастает у детей от 4 до 13 лет, что говорит о сильных динамических изменениях исследуемых признаков и связей внутри сообщества микроорганизмов в данный период. Наоборот, для практически здоровых индивидуумов с 23 лет значения интегрального показателя одинаковы, что может говорить об относительной стабильности микробиома тонкого кишечника (пологий участок кривой, рис. А) вплоть до старческого возраста.

Хорошо известно, что на численность и структуру микробиоты кишечника существенное влияние оказывает большое количество факторов, включая нервную и гормональную регуляцию, факторы врожденного и адап-



**Рисунок. Возрастная траектория изменения сообщества микробиоты тонкого кишечника (А) и показателей иммунной и нейроэндокринной систем (Б) у здоровых лиц**

Figure. Age-related trajectory in altered community of the small intestinal microbiota (A) and parameters of the immune and neuroendocrine systems (B) changes in healthy persons

**Примечание.** Пологие участки кривой (функции), параллельные оси X, означают, что в многомерном пространстве все возрасты, входящие в эти участки, обнаруживают сходные характеристики интегрального показателя и поэтому оцифровываются одинаково. Участки возрастания кривой (функции) говорят о динамических изменениях интегрального показателя в данные возрастные периоды.

Note. Shallow sections of the curve (functions), parallel to the X-axis, imply that in a multidimensional space all ages included in these sections exhibit similar characteristics of the integral indicator and therefore are digitized in the same way. The sections of the curve (function) increase indicate dynamic changes in the integral indicator in these age periods.

тивного иммунитета, обмен веществ, факторы генетической и эпигенетической регуляции (прежде всего, мРНК), диета, прием антибиотиков и др. [5, 15]. Поэтому для оценки кооперации микробиоты тонкого кишечника и основных регуляторных систем (нейроэндокринной и иммунной) в контексте метаорганизма на третьем этапе работы нами была определена возрастная траектория изменения интегрального показателя взаимодействия цитокиновой и нейроэндокринной систем на периферии у практически здоровых лиц и ее согласованность с динамикой микробного сообщества.

В предыдущих исследованиях нами были определены системные уровни шести показателей цитокиновой (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10, IL-4) и семи показателей нейроэндокринной (окситоцин, дофамин, адреналин, норадреналин, кортизол, адренотропный гормон (АКТГ) и серотонин) систем в разных возрастных группах практически здоровых людей [2, 6], которые были использованы для построения возрастной траектории изменения интегрального показателя взаимодействия основных регуляторных систем метаорганизма (рис., Б). Как видно из рис. Б, кривая значений интегрального показателя изменений иммунной и нейроэндокринной систем постепенно

возрастает у детей от 4 до 10 лет и у индивидуумов от 36 до 80 лет, что свидетельствует о динамических флуктуациях значений исследуемых признаков и связей между ними в данные периоды. У людей в возрасте 21–35 лет и старше 80 лет значения интегрального показателя цитокиновой и нейроэндокринной систем одинаковы, что говорит о динамически устойчивом состоянии этих систем (пологие участки кривой, рис. Б). Полученная нами траектория четко соответствует основным этапам развития иммунной и нейроэндокринной систем, и отражает критические периоды (возрастающие участки кривой, рис. Б) [7, 8]. В эти периоды развития происходит становление/угасание структуры и функции иммунной и нейроэндокринной систем, что находит отражение в высокой вариабельности (в том числе межиндивидуальной) показателей и их динамических изменениях из года в год.

Высокая лабильность показателей и формирование связей между основными регуляторными системами метаорганизма у детей оказывает существенное влияние на колебания численности и структуры микробиоты кишечника, наблюдаемых нами вплоть до репродуктивного возраста. Наоборот, пластичность и согласованность функционирования иммунной и нервной

систем у людей репродуктивного возраста определяют состояние динамического равновесия микробного сообщества тонкого кишечника в этот период, что согласуется с исследованиями ряда авторов [11, 14]. Для микробиоты тонкого кишечника практически здоровых людей в пожилом и старческом возрасте характерна, как нами показано ранее, максимальная степень кооперации между основными членами сообщества [4]. Это может приводить к повышению метаболической эффективности работы микроорганизмов и служить одним из механизмов адаптации, обеспечивая стабильность си-

стемы на новом уровне, на фоне динамических изменений функционирования основных регуляторных систем метаорганизма [10].

Таким образом, использование методов ГХМС ММ и оптимального шкалирования позволяет расширить наши представления о возраст-ассоциированной траектории изменений микробиоты тонкого кишечника и ее кооперации с иммунной и нейроэндокринной системами в рамках метаорганизма, что может найти применение в разработке новых способов терапии инфекционных, опухолевых, аутоиммунных, аллергических и неврологических заболеваний.

## Список литературы/References

1. Аверина О.В., Даниленко В.Н. Микробиота человека: роль в становлении и функционировании нервной системы // Микробиология. 2017. Т. 86, № 1. С. 5–24. [Averina O.V., Danilenko V.N. Human microbiota: role in the formation and functioning of the nervous system. *Mikrobiologia = Microbiology*, 2017, vol. 86, no. 1, pp. 5–24. (In Russ.) doi: 10.7868/S0026365617010050]
2. Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю. Конгруэнтность и фенотипическая пластичность иммунной и нервной систем у детей с расстройствами аутистического спектра в сравнении с расстройствами шизофренического спектра // Медицинская иммунология. 2020. Т. 22, № 4. С. 703–716. [Burmistrova A.L., Filippova Yu.Yu. Congruency and phenotypic plasticity of immune and nervous systems in children with autism spectrum disorders compared to schizophrenia spectrum disorders. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, vol. 22, no. 4, pp. 703–716. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-CAP-1968]
3. Лифшиц К., Захарова И.Н., Дмитриева Ю.А. Влияние кишечного микробиома в норме и патологии на здоровье человека // Медицинский совет. 2017. № 1. С. 155–159. [Lifshitz L., Zakharova I.N., Dmitrieva Y.A. Effect of intestinal microbiome in norm and pathology on human health. *Meditinskiy sovet = Medical Council*, 2017, no. 1, pp. 155–159. (In Russ.) doi: 10.21518/2079-701X-2017-1-155-159]
4. Метаорганизм. Стресс и адаптация. Под ред. А.Л. Бурмистровой. Челябинск: Изд-во Челяб. гос. ун-та, 2019. 239 с. [Metaorganism. Stress and adaptation. *Chelyabinsk: Chelyabinsk State University Publishing House*, 2019. 239 p. (In Russ.)]
5. Попова А.Ю., Кафтырева Л.А., Сужаева Л.В., Войтенкова Е.В., Забровская А.В., Егорова С.А., Макарова М.А., Матвеева З.Н., Зуева Е.В., Порин А.А., Буаро М.Й., Константинов О.К., Тотолян А.А. Сравнительная характеристика особенностей микробиоты кишечника жителей Гвинейской Республики и России // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 375–382. [Popova A.Yu., Kaftyreva L.A., Suzhaeva L.V., Voitenkova E.V., Zabrovskaya A.V., Egorova S.A., Makarova M.A., Matveeva Z.N., Zueva E.V., Porin A.A., Boiro M.Y., Konstantinov O.K., Totolian A.A. Comparative characteristics of intestine microbiome of Republic of Guinea and Russian Federation residents. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 375–382. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-375-382]
6. Филиппова Ю.Ю., Бурмистрова А.Л. Когнитивная ось старости: воспаление — микробиота тонкого кишечника // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2017. № 5. С. 3–9. [Filippova Yu.Yu., Burmistrova A.L. Cognitive axis of ageing: inflammation — small intestine microbiota. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, no. 5, pp. 3–9. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-2017-5-3-9]
7. Щеплягина Л.А., Круглова И.В. Возрастные особенности иммунитета у детей // Русский медицинский журнал. 2009. № 23. С. 1564. [Shechplyagina L.A., Kruglova I.V. Age characteristics of immunity in children. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2009, no. 23, p. 1564. (In Russ.)]
8. Arain M., Haque M., Johal L., Mathur P., Nel W., Rais A., Sandhu R., Sharma S. Maturation of the adolescent brain. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 2013, vol. 9, pp. 449–461. doi: 10.2147/NDT.S39776
9. Belkaid Y., Hand T.W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, 2014, vol. 157, no. 1, pp. 121–141. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.011
10. Coyte K.Z., Schluter J., Foster K.R. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability. *Science*, 2015, vol. 350, no. 6261, pp. 663–666. doi: 10.1126/science.1262602
11. Ding T., Schloss P.D. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature*, 2014, vol. 509, no. 7500, pp. 357–360. doi: 10.1038/nature13178
12. El Aidy S., van den Bogert B., Kleerebezem M. The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2015, vol. 32, pp. 14–20. doi: 10.1016/j.copbio.2014.09.005
13. Esser D., Lange J., Marinus G., Sieber M., Best L., Prasse D., Bathia J., Rühlemann M.C., Boersch K., Jaspers C., Sommer F. Functions of the microbiota for the physiology of animal metaorganisms. *J. Innate Immun.*, 2019, vol. 11, no. 5, pp. 393–404. doi: 10.1159/000495115
14. Faith J.J., Guruge J.L., Charbonneau M., Subramanian S., Seedorf H., Goodman A.L., Clemente J.C., Knight R., Heath A.C., Leibel R.L., Rosenbaum M., Gordon J.I. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, 2013, vol. 341, no. 6141: 1237439. doi: 10.1126/science.1237439
15. Hasan N., Yang H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *Peer. J.*, 2019, vol. 7: e7502. doi: 10.7717/peerj.7502

16. Kastl A.J. Jr, Terry N.A., Wu G.D., Albenberg L.G. The structure and function of the human small intestinal microbiota: current understanding and future directions. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 2020, vol. 9, no. 1. pp. 33–45. doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.07.006
17. Levy M., Thaiss C.A., Elinav E. Metabolites: messengers between the microbiota and the immune system. *Genes Dev.*, 2016, vol. 30, no. 14, pp. 1589–1597. doi: 10.1101/gad.284091.116
18. Mariat D., Firmesse O., Levenez F., Guimarães V., Sokol H., Doré J., Corthier G., Furet J.P. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology*, 2009, vol. 9: 123. doi: 10.1186/1471-2180-9-123
19. Segal J.P., Mullish B.H., Quraishi M.N., Acharjee A., Williams H.R.T., Iqbal T., Hart A.L., Marchesi J.R. The application of omics techniques to understand the role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease. *Therap. Adv. Gastroenterol.*, 2019, vol. 12: 1756284818822250. doi: 10.1177/1756284818822250

---

**Авторы:**

**Филиппова Ю.Ю.**, к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия;

**Холодилина М.Е.**, аспирант кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия;

**Бурмистрова А.Л.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия.

**Authors:**

**Filippova Yu.Yu.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation;

**Kholodilina M.E.**, Postgraduate Student, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation;

**Burmistrova A.L.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation.

---

Поступила в редакцию 06.11.2020  
Принята к печати 30.05.2021

Received 06.11.2020  
Accepted 30.05.2021

## 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, кДа 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 <a href="http://www.e-library.ru">www.e-library.ru</a> . 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](http://www.agrk.org) — индекс 41392.  
 Цена свободная.  
 Подписка на электронную версию журнала  
 на сайте [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)**

# АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

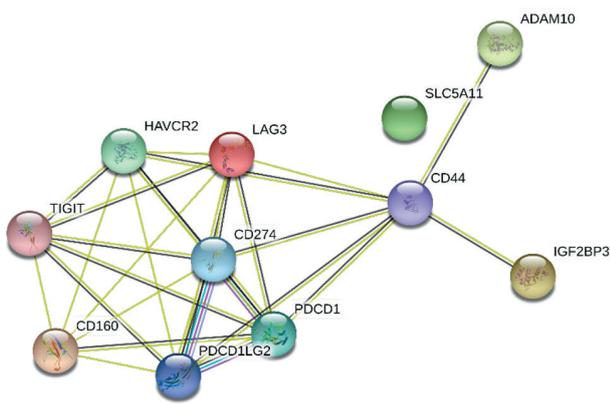
Абросимова Ю.Г.	1050	Ларионова Н.В.	1009	Штрек С.В.	1173
Аль Фаррух М.	1009	Ленц П.А.	1173	Щелкунов С.Н.	1167
Анисимова А.А.	1141	Лукманова Г.В.	1159	Якубидский С.Н.	1167
Антипова А.Ю.	1179	Любовцева Е.В.	1067	Ahmadpour E.	1083
Баймухаметова А.М.	1159	Любовцева Л.А.	1067	Alipour M.	1083
Балацкая Н.В.	1123	Магассуба Н'Ф.	1179	Aprilia A.	1095
Беленюк В.Д.	1141	Мякошина Е.Б.	1123	Aryati A.	1095
Бичурина М.А.	1179	Поздеев О.К.	1037	Bashiri H.	1020
Блохина И.А.	1173	Поздеева А.О.	1037	Boskabadi H.	1089
Бондаренко П.Б.	1152	Попкова М.И.	1057	Derakhshan S.	1075
Борисов А.Г.	1141	Пузряк П.Д.	1152	Egorova S.A.	1131
Брызгалова Д.А.	1057	Пьянков С.А.	1167	Falak R.	1083
Бурмистрова А.Л.	1190	Рар В.А.	1173	Hajizadeh M.	1083
Валеева Ю.В.	1037	Рудаков Н.В.	1173	Hosseinzadeh R.	1083
Ведерникова Е.С.	1152	Рудакова С.А.	1173	Huyh H.K.T.	1131
Гималдинова Н.Е.	1067	Руденко Л.Г.	1009	Iskandar A.	1095
Глебова Т.И.	1159	Саакян С.В.	1123	Jaya W.	1095
Григорьева Е.П.	1009	Савинова А.Н.	1037	Karbalaei M.	1185
Гуляев П.Е.	1037	Савченко А.А.	1141	Keikha M.	1185
Дегтярев А.М.	1152	Сактаганов Н.Т.	1159	Khaksari M.	1020
Егорова С.А.	1179	Самойленко И.Е.	1173	Mashkani B.	1089
Еремкина Т.Я.	1050	Сахарнов Н.А.	1057	Mohammadi Sh.	1075
Ерофеев А.А.	1152	Сенатская А.О.	1057	Ostankova Yu.V.	1131
Жиравковская Е.В.	1173	Сергеев А.А.	1167	Pramadhani A.	1095
Иголкина Я.П.	1173	Соболева Е.А.	1057	Rafiei-Sefiddashti R.	1083
Камара Ж.	1179	Тикуннова Н.В.	1173	Rezaee A.	1075
Киселева И.В.	1009	Титова К.А.	1167	Sabet N.	1020
Кливленева Н.Г.	1159	Ткачев С.Е.	1173	Sadeghian M.H.	1089
Костина Ю.А.	1050	Тонких Ю.Л.	1141	Schemelev A.N.	1131
Кострыкина Т.В.	1173	Тотолян Арег А.	1179	Semenov A.V.	1131
Кричевская Г.И.	1123	Уткин О.В.	1057	Serikova E.N.	1131
Ксенафонтов А.Д.	1009	Филиппова Ю.Ю.	1190	Soltani Z.	1020
Кудрявцев И.В.	1141	Ходза И.Э.	1152	Tavakoli-Yaraki M.	1083
Куликова И.Г.	1123	Холодилина М.Е.	1190	Totolian Areg A.	1131
Кулова Е.А.	1057	Цуканов В.В.	1141	Valutie D.E.	1131
Кумпан Л.В.	1173	Черепнин М.А.	1141	Vincentia M.I.	1095
Кутилин Д.С.	1108	Чижова К.А.	1152	Zakerihamidi M.	1089
Лаврентьева И.Н.	1179	Шломин В.В.	1152	Zueva E.B.	1131
Лапштаева А.В.	1050	Шолан Р.Ф.	1101		

# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

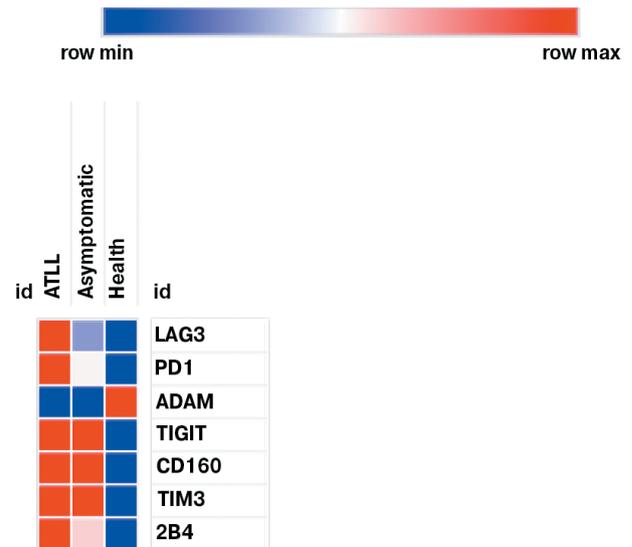
16S рРНК	1108	лечение	1141	albumin	1095
антитела	1167	лечение COVID-19	1152	angiotensin-converting enzyme 2	1020
Арбидол	1159	люди репродуктивного возраста	1190	apparently healthy residents	1131
аттенуация	1167	межпандемический период	1009	APUD-система	1067
бактерии	1050	метронидазол	1037	ATLL	1185
ВГЧ6А	1057	микробиота	1050	benign tumour	1083
ВГЧ6В	1057	микробиота тонкого кишечника	1190	biofilm	1075
вегетативная нервная система	1067	нейрогормоны	1190	blood culture	1089
вирус гепатита С	1141	нервные клетки	1050	Candidatus <i>Rickettsia tarasevichiae</i>	1173
вирус гриппа	1159	новая коронавирусная инфекция	1152	COVID-19	1009, 1020
вирус осповакцины	1167	ортопоксвирусы	1167	drug resistance	1075
вирусная нагрузка	1057	острые респираторные вирусные		early onset sepsis	1089
вирусы	1050	инфекции	1009	estrogen	1020
внебольничная вирусная пневмония	1152	пандемии	1009	exoenzyme	1075
возрастная группа	1179	пандемический период	1009	gender difference	1020
воспаление	1050, 1101	пандемия XXI века	1152	genotype	1131
высокопроизводительное		плазмодиты	1101	HAM/TSP	1185
секвенирование	1108	пожилые люди	1190	HBV	1131
ВЭБ1	1057	популяционный иммунитет	1179	HCV	1131
ВЭБ2	1057	пробиотики	1037	<i>Helicobacter pylori</i>	1037
газовая хромато-масс-спектрометрия		протективность	1167	HTLV-1	1185
микробных маркеров	1190	ПЦР	1057	immunity	1185
Гвинейская Республика	1179	рассеянный склероз	1050	infection	1089
генетическая предрасположенность	1050	резистентность	1159	inflammation	1020
генотип	1141	Ремантадин	1159	lactate	1095
генотипирование	1057	риккетсиозы	1173	lactate/albumin ratio	1095
герпесвирусная инфекция	1123	серотонин	1067	LIRs	1185
гранулярные люминесцирующие		синдром болезненного мочевого		malignancy	1185
клетки	1067	пузыря	1101	malignant tumour	1083
грипп	1009	субпопуляции лимфоцитов	1123	molecular epidemiology	1131
демиелинизация	1050	Тамифло	1159	mortality	1095
дети	1190	Т-лимфоциты	1141	neonates	1089
дискриминантный анализ	1108	туберкулез	1067	nucleated red blood cells	1089
дифференциальная детекция	1057	тучные клетки	1067, 1101	prematurity	1089
исодовые клеши	1173	увальная меланома	1123	primary bone tumour	1083
иммунитет	1123	ультрафиолетовое облучение крови	1152	progesterone	1020
иммунный ответ	1167	урогенитальный тракт	1108	prognosis	1095
иммунофенотипирование	1123	фенотип	1141	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1075
Ингавирин	1159	хронический вирусный гепатит С	1141	real-time PCR	1083
ингибитор протонной помпы	1037	хроническое воспаление	1108	<i>Rickettsia sibirica</i>	1173
интерстициальный неязвенный		цитокины	1101, 1190	SARS-CoV-2	1009
цистит	1101	чувствительность	1159	sepsis	1095
интерстициальный цистит	1101	эпидемии	1009	Southern Vietnam	1131
инфекции	1108	эрадикационная терапия		<i>Toxoplasma gondii</i>	1083
катехоламины	1067	<i>Helicobacter pylori</i>	1037	toxoplasmosis	1083
klarитромицин	1037	этиологические агенты	1173	type III secretion system	1075
клинические проявления	1173	язва Гуннера	1101	viral hepatitis markers	1131
корь	1179	язва роговицы с вовлечением		virulence	1075
левофлоксацин	1037	увального тракта	1123		

**Иллюстрации к статье «Блокада LIRs как новый подход к диагностике и лечению Т-клеточного лейкоза взрослых» (авторы: М. Кеиха, М. Карбалаеи) (с. 1185–1189)**

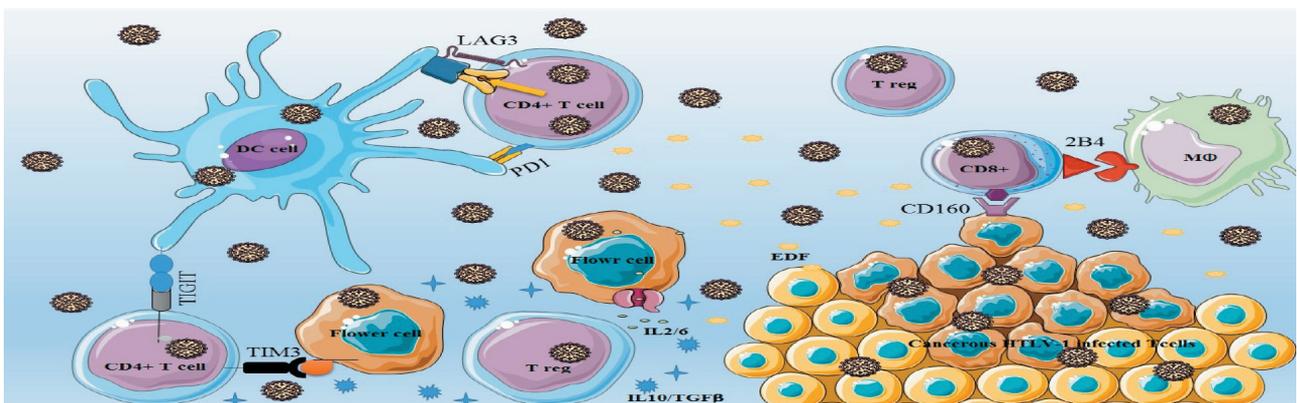
Illustrations for the article “Blockade of LIRs as a new approach for diagnostics and treatment of ATLL malignancy” (authors: Keikha M., Karbalaeei M.) (pp. 1185–1189)



**Figure 1. The protein network interaction between various lymphocyte inhibitory receptors (LIRs)**



**Figure 2. The heatmap of the lymphocyte inhibitory receptors expressed genes in HTLV-1 infected patients; colors demonstrate the expression level of each gene**



**Figure 3. Proposed hypothesis network to determine the crucial role of lymphocyte inhibitory receptors in alternation of signaling pathway in tumor microenvironment of ATLL patients**

**Подписной индекс:**  
Роспечать – 95001  
Пресса России – 41392

