

2022

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

15 сентября 1922 года
День образования государственной
санитарно-эпидемиологической службы России



ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

май–июнь

2022, том 12

№ 3

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

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

- Апт А.С.** д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики Центрального НИИ туберкулеза, Москва, Россия
Барбеито Л. д.м.н., профессор, зав. лабораторией нейродегенерации Института Пастера, Монтевидео, Уругвай
Брей П. д.б.н., профессор, зав. лабораторией медицинской энтомологии и биологии переносчиков болезней Института Пастера в Лаосе, 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
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, научный руководитель ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
Лоузир Э. профессор, президент 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
Маеда К. д.вет.н., профессор, директор Национального института инфекционных заболеваний, Токио, Япония
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, зав. отделом инфекционной микробиологии Института микробиологии им. Стефана Ангеловфа, София, Болгария
Онищенко Г.Г. д.м.н., профессор, академик РАН, зам. председателя Российской академии образования, Москва, Россия
Покровский В.В. д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель Федерального НМЦ по профилактике и борьбе со СПИДом, Москва, Россия
Сантони А. зам. директора по научной работе Института Пастера в Риме, профессор иммунологии и иммунопатологии отдела молекулярной медицины Университета Сапиенца в Риме, Рим, Италия
Симбирцев А.С. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
Тотоян Артем А. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
Фрейдлин И.С. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
Хаитов Р.М. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия
Черешнев В.А. д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель Института иммунологии и физиологии, Екатеринбург, Россия
Шпигель А. д.м.н., профессор, директор Института Пастера Мадагаскара, Антананариву, Мадагаскар

Редакционный совет

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

Ответственный секретарь: Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)
Редактор перевода: Исаков Д.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)
Выпускающий редактор: Мурадян А.Я., к.м.н. (Санкт-Петербург)
Редактор электронной версии: Ерофеева В.С. (Санкт-Петербург)

Учредители

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Подписано в печать 28.06.2022 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1202

© Инфекция и иммунитет
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2022
© НИИЭМ имени Пастера, 2022
© СПб РО РААКИ, 2022

Russian Journal of Infection and Immunity (Infektsiya i immunitet)

May–June

2022, volume 12

No. 3

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

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, Head of the Laboratory of Neurodegeneration, 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

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, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation

Hechmi Louzir Professor, Institute Pasteur de Tunis, President, 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

Ken Maeda PhD, MD (Veterinary), Professor, National Institute of Infectious Diseases, Director, Tokyo, Japan

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; Head of the Department of Infectious Microbiology, Sofia, Bulgaria

Gennadiy G. Onishchenko PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Deputy President of the Russian Academy of Education, 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
Lidiia A. Kaftyreva	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Intestinal Infections, St. Petersburg, Russian Federation
Kirill P. Kashkin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Professor of the Department of Immunology, Moscow, Russian Federation
Olga I. Kubar	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
Victor V. Maleev	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Adviser of the Director, Moscow, Russian Federation
Olga V. Narvskaya	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg, Leading Researcher, Russian Federation
Alevtina M. Savicheva	PhD, MD (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation
Sergei A. Selkov	PhD, MD (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation
Viktor V. Tets	PhD, MD (Medicine), Professor, Pavlov State Medical University, Head of the Department of Microbiology and Virology, St. Petersburg, Russian Federation
Susanna M. Kharit	PhD, MD (Medicine), Professor, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Head of the Prevention Department of Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation
Sergei B. Cheknev	PhD, MD (Medicine), N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Deputy Director on Science, Head of the Laboratory of Cellular Interactions, Moscow, Russian Federation
Vyacheslav V. Shkarin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, State Medical Academy, President, Head of the Department of Epidemiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

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

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

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

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

Founders

North-West Regional Branch of Medical Sciences

Saint Petersburg Pasteur Institute

Russian Association of Allergologists and Clinical Immunologists, St. Petersburg Regional Branch (SPb RAACI)

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass media in Saint Petersburg and Leningrad region

Certificate of registration PI no. TU 78–00578 from April, 26, 2010

Certificate of registration PI no. TU 78–00910 from June, 24, 2011

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media

Certificate of registration PI no. FS 77–64788 from February, 02, 2016

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

Since 2012, the Infection and Immunity journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science

Since 2014 the Infection and Immunity journal is included into international Ulrich's Periodicals Directory database

Since 2016 included in Russian Science Citation Index (RSCI) database, integrated in Web of Science

Since 2016 the Russian Journal of Infection and Immunity is included in Web of Science (Emerging Sources Citation Index)

Since 2017 the Russian Journal of Infection and Immunity is included into international Scopus database

Editorial Office

197101, St. Petersburg, Mira str., 14.
Tel.: (812) 233-08-58.

Publishing House of St. Petersburg Pasteur Institute

197101, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone/fax: (812) 232-07-42.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Produced at the Allegro Printing House

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

Passed for printing 28.06.2022. Print format 60 x 90 1/8.
Offset printing. Printed sheets 25.
Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies).

© Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet

© North-West Regional Branch of Medical Sciences, 2022

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2022

© SPb RAACI, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Тотолян Арег А.

Т-ХЕЛПЕРЫ И ИХ КЛЕТКИ-МИШЕНИ ПРИ COVID-19 409

Казачинская Е.И., Арипов В.С., Иванова А.В., Шестопапов А.М.

ЛИХОРАДКА ЛАССА. ЧАСТЬ 1. ЭТИОЛОГИЯ, ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА 427

Кудлай Д.А., Докторов Н.П.

**АНТИГЕНЫ ESAT-6 И CFP-10 КАК СУБСТРАТ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ МОЛЕКУЛЫ.
ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ** 439

Агеев В.А., Агеев И.В., Сидоренко С.В.

**КОНВЕРГЕНЦИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ГИПЕРВИРУЛЕНТНОСТИ
У KLEBSIELLA PNEUMONIAE** 450

Оригинальные статьи

Попкова М.И., Уткин О.В., Брызгалова Д.А., Сенатская А.О., Соболева Е.А., Сахарнов Н.А.,
Филатова Е.Н., Кулова Е.А.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ ВЭБ-1/ВЭБ-2
И ВГЧ-6А/ВГЧ-6В В СЛЮНЕ** 461

Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Меледина И.В., Желтова О.И., Шевела Е.Я., Останин А.А., Черных Е.Р.

**СУБПОПУЛЯЦИИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МОНОЦИТОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ
ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ВИРУСНЫМ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ** 475

Лесник Э.В., Гинда С.С.

**ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ИММУННЫЕ КОМПЛЕКСЫ КАК БИОМАРКЕРЫ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ
ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ** 486

Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Закиров Р.Ш., Афридонова З.Э.

СОПОСТАВЛЕНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТЧНОГО ИММУНИТЕТА У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 495

Иванова И.А., Труфанова А.А., Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Носков А.К., Чемисова О.С.

**КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ПОПУЛЯЦИЙ И СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ
У ПЕРЕНЕСШИХ НОВУЮ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ** 505

Норузян М., Шарифи-Сарасиаби К., Наджафи-Асл М., Хассани Азад М., Эстабрагния Бабаки Х.

**ОЦЕНКА СЫВОРОТОЧНЫХ УРОВНЕЙ IL-6 И АДИПОНЕКТИНА У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19
И ИХ СВЯЗИ С ТЯЖЕСТЬЮ ЗАБОЛЕВАНИЯ** 511

Арзуманян В.Г., Колыганова Т.И., Свитич О.А., Самойликов П.В., Конаныхина С.Ю., Зайцева Т.А., Зверев В.В.

**ВКЛАД ЛАКТОФЕРРИНА, СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА
КЛАССА А В АНТИМИКРОБНУЮ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ ГРУДНОГО МОЛОКА** 519

Дзагурова Т.К., Мурзабаева Р.Т., Кутлугужина Ф.Г., Морозов В.Г., Вольных Э.В., Курашова С.С., Баловнева М.В.,
Ткаченко П.Е., Ишмухаметов А.А., Белякова А.В., Ткаченко Е.А.

**ЗНАЧЕНИЕ ЭКСКРЕТИРУЕМЫХ С МОЧОЙ АНТИТЕЛ В СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ
ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ** 527

Троценко О.Е., Бондаренко А.П., Пшеничная Н.Ю., Зайцева Т.А., Гарбуз Ю.А., Чишагорова И.В., Шмыленко В.А.,
Базыкина Е.А., Огиенко О.Н.

**ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ОПАСНОСТИ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ ДВУХ БОЛЬНИЧНЫХ СТАЦИОНАРОВ
г. ХАБАРОВСКА В ПЕРИОД НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (ДЕКАБРЬ 2020 г. — МАРТ 2021 г.)** 535

Смольникова М.В., Малинчик М.А., Терещенко С.Ю.

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА МАННОЗОСВЯЗЫВАЮЩЕЙ ЛЕКТИН-АССОЦИИРОВАННОЙ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕАЗЫ
(MASP2) У КОРЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РОССИЙСКИХ АРКТИЧЕСКИХ ТЕРРИТОРИЙ** 543

Безадмер Р., Неджадкеха Э.

**ВЗАИМОСВЯЗЬ СТЕПЕНИ ПОЗИТИВНОСТИ МАЗКА МОКРОТЫ И РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ
ОРГАНОВ ГРУДНОЙ КЛЕТКИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ: ОДНОМОМЕНТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ** 551

Боскабади Х., Рахшанизаде Ф., Закерихамиди М.

**СРАВНЕНИЕ УРОВНЕЙ ВИТАМИНА D У МАТЕРЕЙ И НОВОРОЖДЕННЫХ С ДЛИТЕЛЬНЫМ
ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫМ РАЗРЫВОМ ПЛОДНЫХ ОБОЛОЧЕК И БЕЗ НЕГО** 556

Краткие сообщения

Колотова О.Н., Катаева Л.В., Бакштановская И.В., Степанова К.Б., Степанова Т.Ф.

ФАКТОРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ COVID-19 563

Юдина С.М., Киселева В.В., Русанова Т.С., Иванова И.А.

**ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ COVID-19
У ОДНОЯЙЦЕВЫХ БЛИЗНЕЦОВ** 569

Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Морозов И.А.

**УСИЛЕНИЕ ГЕНЕРАЦИИ ГИДРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА
В ПРИСУТСТВИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ДИАМИНОВ КАК ПРОЯВЛЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО
ВЛИЯНИЯ МИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ** 575

Метельская В.А., Матвеевская Н.С., Гречишников О.Г., Сафронова А.В.

ОЦЕНКА АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К НЕКОТОРЫМ ПЛЕСНЕВЫМ ГРИБАМ 580

В помощь практическому врачу

Ермолаева Ю.А., Самойлова Ю.Г., Олейник О.А., Кудлай Д.А.

ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ. COVID-19 У РЕБЕНКА НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ ПОЧЕК 585

Жеребцова Н.Ю., Кайданек Т.В.

МЕСТНАЯ И ОБЩАЯ РЕАКЦИИ ПРИ ВВЕДЕНИИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ COVID-19 591

Юбилей

К 70-ЛЕТИЮ ВИТАЛИЯ ВАСИЛЬЕВИЧА ЗВЕРЕВА 595

Правила для авторов 597

Авторский указатель 600

Предметный указатель 600

CONTENTS

Reviews

- Kudryavtsev I.V., Golovkin A.S., Totolian Areg A.*
T HELPER CELL SUBSETS AND RELATED TARGET CELLS IN ACUTE COVID-19 409
- Kazachinskaia E.I., Aripov V.S., Ivanova A.V., Shestopalov A.M.*
LASSA FEVER. PART 1. ETIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND CLINICAL MANIFESTATIONS 427
- Kudlay D.A., Doktorova N.P.*
ESAT-6 AND CFP-10 ANTIGENS AS A BIOTECHNOLOGY MOLECULE SUBSTRATE. APPLICATIONS IN MEDICINE 439
- Ageevets V.A., Ageevets I.V., Sidorenko S.V.*
CONVERGENCE OF MULTIPLE RESISTANCE AND HYPERVIRULENCE IN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* 450

Original articles

- Popkova M.I., Utkin O.V., Bryzgalova D.A., Senatskaia A.O., Soboleva E.A., Sakharnov N.A., Filatova E.N., Kulova E.A.*
METHODOLOGICAL APPROACHES TO DIFFERENTIAL DETECTION OF EBV1/EBV2 AND HHV6A/HHV6B IN SALIVA 461
- Lepina O.Yu., Tikhonova M.A., Meledina I.V., Zheltova O.I., Shevela E.Ya., Ostanin A.A., Chernykh E.R.*
TOPICAL ISSUES OF CLINICAL SYMPTOMS AND DIAGNOSTICS OF SEPTIC SHOCK 475
- Lesnic E.V., Ghinda S.S.*
THE CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES AS A BIOMARKER OF THE ENDOGENOUS INTOXICATION IN PULMONARY TUBERCULOSIS 486
- Toptygina A.P., Semikina E.L., Zakirov R.Sh., Afridonova Z.E.*
COMPARISON OF THE HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY IN COVID-19 CONVALESCENTS 495
- Ivanova I.A., Trufanova A.A., Filippenko A.V., Omelchenko N.D., Noskov A.K., Chemisova O.S.*
QUANTITATIVE AND QUALITATIVE COMPOSITION OF LYMPHOCYTE POPULATIONS AND SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH VARYING SEVERITY OF A NEW CORONAVIRUS INFECTION 505
- Norouzian M., Sharifi-Sarasiabi K., Najafi-Asl M., Hassani Azad M., Estabraghnia Babaki H.*
EVALUATION OF SERUM LEVELS OF IL-6 AND ADIPONECTIN IN COVID-19 PATIENTS AND THEIR RELATIONSHIP WITH DISEASE SEVERITY 511
- Arzumanian V.G., Kolyganova T.I., Svitich O.A., Samoilikov P.V., Konanykhina S.Yu., Zaytseva T.A., Zverev V.V.*
AN IMPACT OF LACTOFERRIN, SERUM ALBUMIN AND SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A IN ACTIMICROBIAL ACTIVITY OF BREAST MILK WHEY 519
- Dzagurova T.K., Murzabaeva R.T., Kutluguzhina F.G., Morozov V.G., Volnyh E.V., Kurashova S.S., Balovneva M.V., Tkachenko P.E., Ishmukhametov A.A., Belyakova A.V., Tkachenko E.A.*
URINE EXCRETED ANTIBODIES SIGNIFICANCE IN THE HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME SPECIFIC DIAGNOSIS 527
- Trotsenko O.E., Bondarenko A.P., Pshenichnaya N.Yu., Zaitseva T.A., Garbuz Yu.A., Chishagorova I.V., Shmylenko V.A., Bazykina E.A., Ogienko O.N.*
EVALUATION OF THE TWO IN-PATIENT HOSPITALS ON POTENTIAL ENVIRONMENTAL HAZARD DURING THE PERIOD OF NEW CORONAVIRUS INFECTION IN THE Khabarovsk City (December 2020 – March 2021) 535
- Smolnikova M.V., Malinchik M.A., Tereschenko S.Yu.*
GENE POLYMORPHISM OF MANNANOSE-BINDING LECTIN-ASSOCIATED SERINE PROTEASE (*MASP2*) IN INDIGENOUS POPULATIONS OF THE RUSSIAN ARCTIC TERRITORIES 543
- Behzadmehr R., Nejadkehkhah E.*
SPUTUM SMEAR POSITIVITY GRADE AND CHEST X-RAY FINDINGS IN TUBERCULOSIS: A CROSS-SECTIONAL STUDY 551

Boskabadi H., Rakhshanizadeh F., Zakerihamidi M.

COMPARISON OF VITAMIN D LEVELS BETWEEN MOTHERS AND INFANTS WITH AND WITHOUT PROLONGED MEMBRANE RUPTURE	556
---	------------

Short communications

Kolotova O.N., Kataeva L.V., Bakshantovskaya I.V., Stepanova K.B., Stepanova T.F.

RESISTANCE FACTORS OF <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> BACTERIA DURING COVID-19 PANDEMIC	563
---	------------

Yudina S.M., Kiseleva V.V., Rusanova T.S., Ivanova I.A.

FEATURES OF THE NEW CORONAVIRUS COVID-19 INFECTION IN IDENTICAL TWINS	569
--	------------

Godovalov A.P., Karpunina T.I., Morozov I.A.

ENHANCED HYDROXYL RADICAL GENERATION BY HUMAN LEUKOCYTES EXPOSED TO BACTERIAL DIAMINES HIGHLIGHTING IMMUNOMODULATORY EFFECT OF MICROBIAL METABOLITES	575
---	------------

Metelskaya V.A., Matveevskaya N.S., Grechishnikova O.G., Safronova A.V.

ESTIMATING ALLERGIC SENSITIZATION TO SOME MOLD FUNGI	580
---	------------

For the practical physicians

Ermolaeva Yu.A., Samoilova Yu.G., Oleinik O.A., Kudlay D.A.

THE CLINICAL CASE: COVID-19 IN A CHILD WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE	585
---	------------

Zherebtsova N.Yu., Kajdanek T.V.

LOCAL AND SYSTEMIC ADVERSE REACTIONS FOLLOWING COVID-19 VACCINE	591
--	------------

Jubilee

FOR THE ANNIVERSARY OF VITALII V. ZVEREV	595
---	------------

Instructions to Authors	597
--------------------------------------	------------

Author index	600
---------------------------	------------

Subject index	600
----------------------------	------------

T-ХЕЛПЕРЫ И ИХ КЛЕТКИ-МИШЕНИ ПРИ COVID-19

И.В. Кудрявцев^{1,2}, А.С. Головкин³, Арег А. Тотолян^{1,4}

¹ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Резюме. Данный обзор посвящен анализу субпопуляционного состава и фенотипическим изменениям, которые были отмечены для различных субпопуляций Т-хелперов (Th) периферической крови и их клеток-мишеней у пациентов с острой инфекцией, вызванной SARS-CoV-2. Уже в первых работах, посвященных анализу фенотипа и функциональных характеристик дендритных клеток, отмечалось снижение ключевых молекул, отвечающих за презентацию антигенов (HLA-DR), миграцию в лимфоидную ткань (CCR7) и формирование костимуляционного сигнала (CD80 и CD86). Некоторыми исследователями показано, что SARS-CoV-2-специфические Т-хелперы появлялись в циркуляции уже на 2–4 день после появления первых симптомов, а позднее формирование клонов SARS-CoV-2-специфических Th было связано с неблагоприятным исходом COVID-19. В острой фазе инфекции уровень Th1-клеток изменялся слабо, тогда как среди их основных клеток-мишеней — CD8⁺ Т-лимфоцитов и НК-клеток — в периферической крови преобладали клетки эффекторных популяций с высокой экспрессией маркеров клеточного «старения» (TIM3, PD-1, VISTA, TIGIT и т. д.), а уровень макрофагов жидкости бронхо-альвеолярного лаважа (ЖБАЛ) повышался. При анализе клеток, участвующих в запуске воспаления по 2 типу, большинством исследователей отмечалось увеличение доли CD4⁺ Т-клеток, обладавших фенотипом и свойствами Th2. Более того, снижение в периферической крови основных клеток-мишеней Th2 — базофилов и эозинофилов — было тесно связано с тяжелым течением COVID-19, тогда как в легочной ткани наблюдалось увеличение уровня тучных клеток и активности медиаторов, высвобождавшихся в ходе их дегрануляции. Содержание Th17 в периферической крови могло быть тесно связано с тяжестью течения COVID-19 — минимальные значения этих клеток были характерны для тяжелых форм заболевания, тогда как в составе ЖБАЛ доля Th17 и концентрации секретируемых ими цитокинов резко возрастала. Увеличение в циркуляции нейтрофилов было тесно связано с тяжестью COVID-19, тогда как в рамках общего пула этих клеток возрастала доля незрелых клеток с пониженной способностью к продукции активных форм кислорода. В большинстве работ отмечалось снижение уровня общего уровня Tfh клеток в циркулирующей крови, тогда как в рамках Tfh увеличивалась доля активированных клеток и отмечалось нарушение баланса между «регуляторными» Tfh1 и «провоспалительными» Th2 и Th17. У пациентов с острым COVID-19 в циркуляции были снижены практически все основные субпопуляции «наивных» В-клеток и В-клеток памяти, но отмечалось увеличение доли эффекторных клеток — циркулирующих пред-

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:

Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Тотолян Арег А. Т-хелперы и их клетки-мишени при COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 409–426. doi: 10.15789/2220-7619-THC-1882

Citation:

Kudryavtsev I.V., Golovkin A.S., Totolian Areg A. T helper cell subsets and related target cells in acute COVID-19 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet. 2022, vol. 12, no. 3, pp. 409–426. doi: 10.15789/2220-7619-THC-1882

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-24-20013.

This research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 22-24-20013.

шественников плазматических клеток с фенотипом CD27^{hi}CD38^{hi}CD24⁻, а также функционально неактивных CD21^{low} В-лимфоцитов. Анализ данных литературы указывает на наличие существенных нарушений в функционировании всех основных субпопуляций Th и их клеток-мишеней в острую фазу COVID-19, которые могут сохраняться после элиминации патогена и являться одной из причин проявления «постковидных» нарушений.

Ключевые слова: COVID-19, T-хелперы, субпопуляции T-хелперов 17, фолликулярные T-хелперы, T-хелперы 1, T-хелперы 2.

T HELPER CELL SUBSETS AND RELATED TARGET CELLS IN ACUTE COVID-19

Kudryavtsev I.V.^{a,b}, Golovkin A.S.^c, Totolian Areg A.^{a,d}

^a I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

^b Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c V.A. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Current review presents a brief overview of the immune system dysregulation during acute COVID-19 and illustrates the main alterations in peripheral blood CD4⁺ T-cell (Th) subsets as well as related target cells. Effects of dendritic cell dysfunction induced by SARS-CoV-2 exhibited decreased expression of cell-surface HLA-DR, CCR7 as well as co-stimulatory molecules CD80 and CD86, suggesting reduced antigen presentation, migratory and activation capacities of peripheral blood dendritic cells. SARS-CoV-2-specific Th cells could be detected as early as days 2–4 post-symptom onset, whereas the prolonged lack of SARS-CoV-2-specific Th cells was associated with severe and/or poor COVID-19 outcome. Firstly, in acute COVID-19 the frequency of Th1 cell was comparable with control levels, but several studies have reported about upregulated inhibitory immune checkpoint receptors and exhaustion-associated molecules (TIM3, PD-1, BTLA, TIGIT etc.) on circulating CD8⁺ T-cells and NK-cells, whereas the macrophage count was increased in bronchoalveolar lavage (BAL) samples. Next, type 2 immune responses are mediated mainly by Th2 cells, and several studies have revealed a skewing towards dominance of Th2 cell subset in peripheral blood samples from patients with acute COVID-19. Furthermore, the decrease of circulating main Th2 target cells — basophiles and eosinophils — were associated with severe COVID-19, whereas the lung tissue was enriched with mast cells and relevant mediators released during degranulation. Moreover, the frequency of peripheral blood Th17 cells was closely linked to COVID-19 severity, so that low level of Th17 cells was observed in patients with severe COVID-19, but in BAL the relative number of Th17 cells as well as the concentrations of relevant effector cytokines were dramatically increased. It was shown that severe COVID-19 patients vs. healthy control had higher relative numbers of neutrophils if compared, and the majority of patients with COVID-19 had increased frequency and absolute number of immature neutrophils with altered ROS production. Finally, the frequency of Tfh cells was decreased during acute COVID-19 infection. Elevated count of activated Tfh were found as well as the alterations in Tfh cell subsets characterized by decreased “regulatory” Tfh1 cell and increased “pro-inflammatory” Tfh2 as well as Tfh17 cell subsets were revealed. Descriptions of peripheral blood B cells during an acute SARS-CoV-2 infection were reported as relative B cell lymphopenia with decreased frequency of “naïve” and memory B cell subsets, as well as increased level of CD27^{hi}CD38^{hi}CD24⁻ plasma cell precursors and atypical CD21^{low} B cells. Thus, the emerging evidence suggests that functional alterations occur in all Th cell subsets being linked with loss-of-functions of main Th cell subsets target cells. Furthermore, recovered individuals could suffer from long-term immune dysregulation and other persistent symptoms lasting for many months even after SARS-CoV-2 elimination, a condition referred to as post-acute COVID-19 syndrome.

Key words: COVID-19, CD4⁺ T-cells, Th17 cell subsets, follicular Th cell, Th1, Th2.

Введение

SARS-CoV-2-специфические Т-хелперы (Th) обнаруживаются в циркуляции уже на 2–4 день после появления первых клинических симптомов COVID-19 [81, 96], что обычно связано с легкими формами течения заболевания и быстрой элиминацией вируса из организма [89]. С другой стороны, длительное отсутствие в циркуляции антиген-специфических Th-клеток являлось одним из признаков тяжелого

течения COVID-19 и прогностическим фактором неблагоприятного исхода заболевания [14, 81, 89]. В настоящее время уже известно множество причин, которые лежат в основе отсроченной или замедленной активации системы приобретенного иммунитета при COVID-19. К их числу относятся использование вирусом SARS-CoV-2 стратегий избегания распознавания и индукции неспецифического иммунного ответа [6], связанные, в первую очередь, с блокадой продукции IFN I типа и провоспалитель-

ных цитокинов за счет подавления активности транскрипционного фактора NF-κB, наличие у инфицированных пациентов определенных аллелей молекул МНС I и/или II класса, снижающих презентацию вирусных антигенов для системы приобретенного иммунитета [65], или аллелей клеточных рецепторов ACE2, обеспечивающих высокую эффективность заражения клеток хозяина [40]. Однако в большинстве случаев при инфицировании SARS-CoV-2 происходит быстрая активация различных клеток иммунной системы, что выражается в увеличении экспрессии маркеров клеточной активации моноцитами [29] и лимфоцитами [2, 88], появлении в периферической крови экзосом различного происхождения [54], а также увеличение уровня ключевых провоспалительных цитокинов и белков острой фазы воспаления [11, 42]. Успешная кооперация между клеточными и гуморальными факторами иммунной системы определяет эффективность развития защитной реакции против внедряющегося патогена. Более того, некоторые исследователи указывали, что циркулирующие SARS-CoV-2-специфические Th-клетки обнаруживались у 100% перенесших COVID-19 пациентов, входивших в состав их выборки [35].

О широком спектре распознаваемых вирусных белков также свидетельствует тот факт, что в рамках общего пула вирус-специфических Th-клеток переболевших COVID-19 обнаруживались лимфоциты, способные к распознаванию пептидов из состава S-, M- и N-белков SARS-CoV-2 [76]. В настоящее время описано более 1400 эпитопов, входящих в состав различных белков SARS-CoV-2, которые распознаются различными популяциями CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, что указывает не только на способность системы приобретенного иммунитета распознавать данный патоген, но и на высокую эффективность клеток, участвующих в презентации вирусных антигенов [34]. Также было отмечено, что SARS-CoV-2-специфические Th-клетки способны в первую очередь продуцировать эффекторные цитокины TNFα и IFNγ, свойственные для Th1, а также некоторое количество Th2 (IL-5 и IL-13) и Th17 (IL-17 и IL-22) цитокинов [96]. О формировании пула вирус-специфических Th1-клеток памяти, которые сохранялись как минимум на протяжении 2 месяцев после выздоровления, указывают данные о наличии у переболевших пациентов Tbet-экспрессировавших CD4⁺ Т-лимфоцитов, способных к продукции IFNγ в ответ на стимуляцию вирусными пептидами [75]. В рамках другого исследования *in vitro* было показано, что в рамках общего пула SARS-CoV-2-специфических Th преобладали IFNγ⁺CD4⁺ Th1-клетки, также в достаточном количестве

определялись IL-17⁺CD4⁺ Th17-клеток, тогда как IL-4⁺CD4⁺ Th2-лимфоциты практически отсутствовали [39]. С другой стороны, анализ экспрессии хемокиновых рецепторов на активированных в условиях *in vitro* пептидами SARS-CoV-2 Th-клетках показал, что специфические к S-белку Th-клетки преимущественно обладали фенотипом фолликулярных Th, а M- и S-специфические CD4⁺ Т-лимфоциты были представлены Th1- и Th17.1-клетками [85]. Таким образом, приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что в ответе на SARS-CoV-2 участвуют все основные популяции Т-хелперов, что, в свою очередь, указывает на запуск всех основных типов воспалительных реакций, которые находятся под контролем этих клеток приобретенного иммунитета. Именно поэтому целью данного обзора является анализ описанных в литературе нарушений в механизмах инициации и реализации воспалительных реакций, связанных с различными клетками иммунной системы в острой фазе коронавирусной инфекции.

Дендритные клетки при COVID-19

Запуск специфического иммунного ответа (вне зависимости от его типа) тесно связан с эффективным функционированием системы антиген-презентирующих клеток, главными из которых для Т-хелперов являются дендритные клетки (DC). Циркулирующие в периферической крови DC являются весьма гетерогенной популяцией лейкоцитов, которые традиционно подразделяют на миелоидные или «классические» CD123⁺CD11c⁺ (сDC, от англ. «conventional dendritic cell») и CD123⁺CD11c⁻ плазмацитоподобные (pDC, от англ. «plasmacytoid dendritic cell») дендритные клетки, которые играют важную роль в развитии противовирусного ответа [77]. сDC принято разделять на две основные субпопуляции: сDC1 и сDC2, которые различаются как по своему фенотипу, так и по выполняемым функциям [36]. Так, сDC1 несут на своей мембране BDCA-3 (CD141), Clec9A, CADM1, BTLA и CD26, а также способны к кросс-презентации антигенов цитотоксическим Т-лимфоцитами и «поляризации» «наивных» Т-хелперов в сторону Th1. Тогда как сDC2 обладают фенотипом CD1c⁺ (а также FcεR1⁺SIRPα⁺) и играют ведущую роль в инициации ответа, опосредованного Т-хелперами различных типов, включая Th2, Th9, Th17, фолликулярные Т-хелперы (Tfh) и Treg [20]. Следует отметить, что снижение уровня общего пула DC в циркулирующей крови характерно не только для острого периода заболевания, но и для уже выздоровевших пациентов [107]. Было показано, что у пациентов с тяжелой формой COVID-19 наблюда-

лось снижение миелоидных (CD11c⁺CD123^{lo/-}) и плазматоидных (CD11c⁻CD123⁺) дендритных клеток в циркуляции [57]. Сходные результаты были получены и другой группой исследователей, показавших, что концентрации cDC и pDC снижаются у всех больных COVID-19 вне зависимости от тяжести течения заболевания [59]. В рамках другого исследования было показано, что увеличение соотношения cDC/pDC в циркулирующей крови может рассматриваться в качестве перспективного маркера тяжелого течения COVID-19 [107]. Дальнейшие исследования выявили существенные нарушения фенотипических и функциональных характеристик различных субпопуляций DC [57]. Так, на поверхности циркулирующих в крови pDC был снижен уровень экспрессии CD45RA, а у больных с тяжелой формой заболевания отмечалось снижение экспрессии мРНК HLA-DQA2 и HLA-DR. При детальном анализе фенотипа различных субпопуляций DC было показано, что у пациентов с тяжелым течением COVID-19 на всех популяциях клеток (за исключением cDC1) уровни HLA-DR и CD86 были снижены [58]. Кроме того, на циркулирующих DC возрастал уровень экспрессии ингибиторной молекулы PD-L1, способствующей подавлению активации Т-хелперов при распознавании [98]. Сходные результаты были полу-

чены в ходе *in vitro* стимуляции DC пациентов с COVID-19 лигандами для TLR-3, -4, -7 и -8, когда было показано, что все pDC, cDC1 и cDC2 больных экспрессировали меньше CD80, CD86, CCR7 и HLA-DR, чем клетки условно здоровых добровольцев [107]. Следует подчеркнуть, что снижение функциональной активности циркулирующих DC может носить весьма длительный характер — пониженная плотность экспрессии, например, CD86 отмечается и у выздоровевших после COVID-19, тогда для восстановления нормальной плотности HLA-DR и CCR2 требуется значительно меньшее время [107].

Снижение уровней DC в циркуляции может быть обусловлено их миграцией в лимфоидную ткань, где эти клетки выполняют свои функции, связанные с запуском специфического противовирусного иммунного ответа. Приведенные выше результаты указывают на то, что при тяжелом течении COVID-19 эффективность функционирования практически всех субпопуляций DC может быть снижена, что, в первую очередь, связано со снижением эффективности презентации антигенов (снижение уровня молекул семейства MHC) и формирования костимуляционного сигнала (снижение молекул семейства B7 — CD80 и CD86). Кроме того, снижается уровень активации DC даже по сравнению с легкими формами тече-

Таблица 1. Т-хелперы и их клетки-мишени [10, 22, 26, 27, 93, 108]

Table 1. Main Th cell subsets and their target cells [10, 22, 26, 27, 93, 108]

Т-хелперы Th cell subset	Дендритные клетки/ цитокины Dendritic cells/ cytokines	Эффекторные цитокины Effector cytokines	Клетки-мишени Target cells	Эффекты Effects
Th1	pDC, cDC1/IL-12	IFN γ	Моноциты/M1 макрофаги; CD8 ⁺ Т-лимфоциты; NK-клетки Monocytes/M1 macrophages; CD8 ⁺ T cells; NK-cells	Активация фагоцитоза, АФК, синтез цитокинов, усиление цитолитических свойств Stimulation of phagocytosis, ROS and cytokine production; enhancement of cytotoxicity
Th2	cDC2/IL-4	IL-4, IL-5, IL-13	Базофилы, тучные клетки, эозинофилы Basophils; mast cells; eosinophils	Дегрануляция, выброс медиаторов воспаления Degranulation and pro-inflammatory mediators production
Th17	cDC2/IL-1 β , IL-6, IL-23	IL-17, IL-22	Нейтрофилы/ эпителий Neutrophils/epithelial cells	Активация фагоцитоза и АФК/ секреция слизи Stimulation of phagocytosis and ROS production; mucus secretion
Tfh	cDC2/activin A, IL-12, TGF β (?)	IL-21 (IFN γ , IL-4, IL-5, IL-17)	CD19 ⁺ В-клетки CD19 ⁺ B cells	Гипермутации и переключение класса антител, клетки памяти и плазматические клетки Somatic hypermutations, Igs class- switch; memory and plasma cells

ния COVID-19, что наводит на мысль об использовании вирусом SARS-CoV-2 весьма эффективных стратегий избегания иммунного ответа. Столь же негативное влияние на запуск специфического иммунного ответа оказывает накопление в периферической крови (возможно, за счет привлечения из красного костного мозга) различных незрелых предшественников DC, которые пока еще не обладают эффекторными свойствами и не могут стимулировать Т-клетки.

Т-хелперы 1 типа и их клетки-мишени при COVID-19

В инициации специфического иммунного ответа по 1 типу (направленного против внутриклеточных патогенов — в первую очередь вирусов и бактерий) важную роль играют pDC и cDC1, а также цитокины IL-12 и IFN γ , необходимые для активации ILC1 и «поляризации» Th0 в сторону Th1 [27]. Th1 участвуют в реализации клеточных реакций приобретенного иммунитета за счет продукции провоспалительных цитокинов IFN γ и TNF α , а также IL-2 и IL-15, тогда как главными клетками-мишенями являются тканевые макрофаги, которые

приобретают M1 фенотип, и цитотоксические клетки — CD8⁺ Т-лимфоциты и NK-клетки [5]. Роль Th1-клеток в патогенезе COVID-19 достаточно противоречива. Так, некоторые авторы указывают на положительную роль IFN γ -продуцирующих Th1-клеток при данной патологии и связывают их повышенную активность с более легким течением заболевания [17]. С другой стороны, у возрастных пациентов — группы, которая традиционно характеризуется тяжелым течением COVID-19, отмечалось снижение уровней IFN γ -продуцирующих вирус-специфических клеток, что также косвенно указывает на важную роль именно Th1-клеток в развитии эффективного иммунного ответа [83]. На миграцию Th1-клеток в воспаленные ткани косвенно указывает некоторое снижение доли общего пула этих клеток в периферической крови больных в острой фазе инфекции, что было отмечено сразу в нескольких независимых исследованиях [39, 59, 84]. Хотя некоторыми авторами отмечалось накопление в периферической крови пациентов с тяжелым течением COVID-19 «атипичных» Th1, экспрессировавших на своей поверхности CD161 и IL-1RI, более свойственные «неклассическим» Th17.1 [84]. Важнейшей фенотипической

Таблица 2. Изменения в составе и фенотипе Т-хелперов и их клеток-мишеней при остром COVID-19
Table 2. Alterations in frequencies and phenotypes of Th cell subsets and their target cells during acute COVID-19

Тх и клетки-мишени Th subset/target cell	Содержание Frequency	Изменения фенотипа/состава Phenotype/subset
Th1:	↓ [38, 59, 84]; = [31]	↑CD161 ⁺ [84]
– макрофаги – macrophages	↑ ЖБАЛ [19, 63] ↑ BAL [19, 63]	↑FCN1 ⁺ [63]
– NK-клетки – NK cells	↓ [24, 45, 68, 95]	↑LAG3, PDCD1, HAVCR2 [97]; ↑TIM-3, PD-1 [92]; ↑CD39 [24];
– CD8 ⁺ Т-клетки – CD8 ⁺ T cell	= [67]; ↓ [92]	↓Naive, CM [23, 67, 69]; ↑TIM-3, PD-1 [59]; ↑Ki-67, CD38, HLA-DR [23, 67]; ↑BTLA, TIGIT [84]
Th2:	↑ [23, 30, 31]	↑CXCR3-CCR6 ⁻ [30]
– базофилы – basophile	↓ [80, 90, 94]	↓CD11b, ↓CD294 [94]
– тучные клетки – mast cells	↑ [72]	↑CD117 ⁺ , ↑IL-4 ⁺ [72]
– эозинофилы – eosinophile	↓ [61, 100, 101]	↓CD294, ↑PDL1 [94]
Th17:	↓ [23, 31]	↓Th17.1 [31, 59]; ↑CCR4 ⁺ CXCR3 ⁻ Th17 [31]
– нейтрофилы – neutrophil	↑ [9, 43, 104]	↑CD16 ^{low} [18]; ↑CD10 ^{low} [67, 87]; ↑CD16 ⁺ CD11b ^{hi} [67, 87]
Tfh:	↓ [31, 35]; = [57]; ↑ [84]	↑CD38 ⁺ ICOS ⁺ [69, 88]; ↓Tfh1, ↑Tfh17 [31]; ↑CD38 ⁺ HLA-DR ⁺ [88]
– CD19 ⁺ В-клетки – CD19 ⁺ B cell	↓ [23, 67]	↑CD27-IgD ⁻ [23, 49, 99]; ↑CD38 ^{hi} CD24 ⁻ [23, 31, 49, 55, 68, 99]; ↑CD21 ⁻ [56, 99]; ↓IgD ⁺ CD27 ⁻ , ↓CD27 ⁺ [23, 31, 49, 55, 68]

характеристикой Th1-клеток является наличие хемокинового рецептора CXCR3, благодаря которому эти клетки способны проникать в очаги воспаления по градиенту соответствующих хемокинов — CXCR9, CXCR10 и CXCR11 [12]. Следует отметить, что у пациентов с тяжелым течением COVID-19 было отмечено увеличение в сыворотке крови CXCR9 и CXCR10 [1], которые совместно с увеличенными уровнями как клеточных («неклассические» моноциты, CD38⁺HLA-DR⁺ Т-клетки, а также Т-клетки, несущие перфорин и гранзим В), так и сывороточных (уровни CXCL8, IL-6 и IL-10) факторов и позволяли дифференцировать легкое и тяжелое течение заболевания [2, 38, 59]. Полученные данные, по мнению авторов исследования, указывают на факт связи поляризации в сторону Th1 и высоким цитолитическим профилем Т-клеток у пациентов с тяжелым COVID-19. В рамках другого исследования также была отмечена взаимосвязь между увеличением уровней CXCL10, IL-6 и IL-10 и тяжестью течения заболевания [59]. Более того, при анализе клеток ЖБАЛ пациентов с COVID-19 было отмечено увеличение доли IFN γ - и/или TNF α -продуцирующих Th1, в которых на уровне мРНК отмечалось увеличение экспрессии хемокинов CCL4 и CCL5 или CCL2, CCL18, CXCL9, CXCL10 и CXCL11, соответственно, что способствовало привлечению клеток-эффекторов очаг и воспаления в легочной ткани [103].

В рамках одной из первых работ было показано, что уровень цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови больных COVID-19 мог значимо не изменяться, однако отмечалось снижение уровня «наивных» CD3⁺CD8⁺ клеток в циркуляции на фоне повышения доли более высоко дифференцированных клеток [67]. Минимальные значения как относительного, так и абсолютного содержания CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов в периферической крови были свойственны пациентам с неблагоприятным исходом COVID-19 [92]. Более того, авторами были отмечены обратные зависимости между уровнем цитотоксических Т-лимфоцитов и концентрациями D-димера и ферритина в сыворотке крови больных [69]. В целом, субпопуляционный состав CD3⁺CD8⁺-клеток характеризовался снижением в циркуляции доли «наивных» клеток и клеток центральной памяти [23, 67, 69], что являлось неблагоприятным фактором, так как именно эти популяции клеток способны к быстрому развитию ответа на новые и повторно проникающие в организм антигены, соответственно [3]. Более того, накопление в циркуляции клеток с эффекторным фенотипом (например, EM2 и EMRA с фенотипами

CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁺ CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻, соответственно [69]), а также несущих на своей поверхности маркеры активации Ki-67, CD38 и HLA-DR [23, 69], указывало переход ответа, опосредованного цитотоксическими Т-лимфоцитами, в эффекторную фазу. Помимо маркеров «хронической» активации — CD38 и HLA-DR — столь же важным прогностическим значением обладает оценка экспрессии CD69, который традиционно рассматривается в качестве маркера «ранней» активации цитотоксических Т-клеток. Так, у всех пациентов с COVID-19 уровень CD3⁺CD8⁺CD69⁺ клеток возрастал по сравнению с контролем, однако максимальных значений концентрация этих клеток в крови достигала у пациентов с неблагоприятным прогнозом исхода заболевания [92]. Однако некоторые исследователи отмечали высокую экспрессию эффекторными CD3⁺CD8⁺ клетками маркеров «старения» или «клеточного истощения», которые, как считается, блокируют проявление эффекторных свойств клетками в тканях, способствуя выживанию вирус-инфицированных клеток [16]. Так, на поверхности CD8⁺ Т-клеток отмечалось увеличение экспрессии PD-1 и TIM3, которые традиционно рассматриваются в качестве маркеров «клеточного старения» [59]. Кроме того, увеличение экспрессии PD-1 и TIM3 цитотоксическими Т-лимфоцитами было тесно связано с тяжестью течения заболевания, так как у больных с тяжелой формой COVID-19 содержание этих клеток в циркуляции превосходило значения, полученные для больных с легким течением заболевания [50]. В циркуляции на поверхности CD3⁺CD8⁺-клеток также повышался уровень других ингибиторных молекул — BTLA и TIGIT, которые также можно отнести к группе молекул, ограничивающих проявление эффекторных свойств клетками [84].

Уже первые исследования показали снижение количества NK-клеток в циркулирующей крови у пациентов с COVID-19 [95], а минимальные значения были характерны для больных в критическом состоянии [24, 45]. Длительный воспалительный процесс при COVID-19, связанный с продолжительной высокой вирусной нагрузкой, обычно связан с прогрессивным снижением NK-клеток в циркуляции и может рассматриваться как маркер неблагоприятного исхода заболевания [68]. Также было отмечено увеличение в периферической крови пациентов в критическом состоянии CXCR3⁺ NK-клеток, уровень которых снижался при проведении эффективной терапии [61].

При остром инфекционном процессе, вызванном SARS-CoV-2, отмечаются существенные изменения в фенотипе NK-клеток инфи-

цированных пациентов. Так, при COVID-19 наблюдается увеличение уровня экспрессии ингибиторного рецептора NKG2A [24, 106], который традиционно рассматривается как маркер «клеточного старения», а его наличие напрямую связано с нарушением функциональной активности NK-клеток, что подтверждается снижением уровней экспрессии NK-клетками цитокинов (IFN γ , IL-2 и TNF α), а также маркера дегрануляции CD107a [106]. Эти результаты были подтверждены опытами *in vitro*, когда была обнаружена сниженная продукция IFN γ и CD107a NK-клетками пациентов с COVID-19 при совместном культивировании с клетками линии K562 [70]. Данные молекулярно-биологических исследований также указывают на снижение цитолитических функций у NK-клеток пациентов с COVID-19 [102]. В ходе дальнейших исследований на NK-клетках было показано увеличение экспрессии трех других маркеров «клеточного старения» — LAG3, PDCD1 и HAVCR2 [97], а также TIM-3 и PD-1 [92]. Кроме того, среди NK-клеток пациентов с COVID-19 было отмечено увеличение клеток, несущих на своей поверхности CD39 — экзофермент, способный запускать каскад реакций, приводящих к формированию из провоспалительного АТФ противовоспалительного аденозина [24], что также может снижать эффективность противовирусного ответа.

Еще одним типом клеток-мишеней для Th1 являются общий пул тканевых макрофагов, формирующийся как за счет резидентных клеток, так и циркулирующих в крови моноцитов, которые пополняют пул тканевых макрофагов различной локализации, хотя преимущественно мигрируют в очаги воспаления [41]. Что же касается анализа процессов инфильтрации и функций моноцитов в воспаленных тканях, то при COVID-19 особое внимание традиционно уделяется тканям легких. Было показано, что в жидкости бронхо-альвеолярного лаважа (ЖБАЛ) у пациентов с тяжелой формой течения COVID-19 при сравнении со средней степенью тяжести содержалось больше макрофагов и нейтрофилов, тогда как уровни дендритных клеток (как pDC, так и cDC) и Т-лимфоцитов были снижены [63]. Накопление макрофагов в легочной ткани было связано с направленной миграцией моноцитов из периферической крови и их дифференцировкой в FCN1⁺-макрофаги, которые обладали высокой провоспалительной активностью. Более того, эти легочные макрофаги у пациентов с тяжелым течением COVID-19 экспрессировали большое количество провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF и хемокинов (CCL2, CCL3, CCL4 и CCL7). Сходные результаты были по-

лучены Chua R.L. и соавт., показавшими, что у пациентов с тяжелым COVID-19 макрофаги, которые формировались в ходе *in vitro* дифференцировки циркулирующих моноцитов, экспрессировали высокие уровни CCL3 [19]. Тогда как «не резидентные» макрофаги у тяжелых больных характеризовались выраженным провоспалительным фенотипом, который был связан с повышенными уровнями экспрессии генов, кодирующих хемокины CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL20 и CXCL1, а также некоторых провоспалительных цитокинов IL-8, IL-18 и TNF.

Т-хелперы 2 типа и их клетки-мишени при COVID-19

Клеточный иммунный ответ по 2 типу (Th2 и ILC2) характеризуется притоком в воспаленную ткань эозинофилов, тучных клеток, базофилов и альтернативно активированных макрофагов (M2), а также ремоделированием тканей слизистых с увеличением доли продуцирующих слизь клеток, повышенной сократимостью гладкомышечных клеток, и, в конечном итоге, развитием фиброза [108]. Этот тип воспаления был сформирован в ходе эволюции для защиты от гельминтов, а также от укусов змей, насекомых и клещей. Ключевую роль в запуске ответа играют эпителиоциты барьерных тканей и различные клетки соединительной ткани, а для «поляризации» Th0 в сторону Th2 важны cDC2 и IL-4 [10]. Дифференцированные Th2-клетки при распознавании патогена секретируют цитокины IL-4, IL-5 и IL-13, хотя основной «мишенью» Th2-клеток являются многоклеточные патогены при COVID-19 обнаруживаются вирусспецифические Th2 [96], а в сыворотке крови больных в острой фазе инфекции выявляются высокие уровни цитокинов Th2-клеток [38]. В периферической крови больных также отмечалось увеличение доли CCR4⁺ и GATA3⁺ Т-хелперов, в составе ядра [23]. Увеличение в крови Th2-клеток с фенотипом CXCR3⁻CCR6⁻ было тесно связано с неблагоприятным исходом у пациентов с тяжелым течением COVID-19, что позволило рассматривать этот показатель в качестве независимого маркера прогноза [30]. Что же касается воспаленной ткани, то при анализе клеток из состава ЖБАЛ пациентов с тяжелым COVID-19 отмечалось увеличение экспрессии не только генов ключевых факторов, отвечающих за «поляризацию» клеток в сторону Th2 (GATA3, IL4R и MAF), хотя по уровням продукции основных Th2-цитокинов больные с различной тяжестью течения COVID-19 не различались [47]. Более того, у выздоровевших после COVID-19 паци-

ентов высокий уровень Th2-клеток сохранялся в крови на протяжении нескольких месяцев, тогда как уровни IL-4, IL-5 и IL-13 достоверно не отличались от контрольных значений [32].

Для острой фазы COVID-19 отмечено снижение уровня базофилов в периферической крови больных [94], причем минимальные значения отмечались для пациентов с неблагоприятным исходом заболевания [90]. Восстановление уровня этих клеток до нормативных значений могло рассцениваться как прогностический параметр перехода от острой фазы воспаления, вызванного COVID-19, к фазе восстановления [80]. Что же касается изменения фенотипа базофилов, то у пациентов с COVID-19 отмечается снижение уровней экспрессии интергинового рецептора CD11b и рецептора для простагландина D2 (CRTH2 или CD294) на поверхности базофилов по сравнению с клетками аналогичной популяции условно здоровых добровольцев [94]. Кроме того, при сравнении пациентов с тяжелым и легким течением COVID-19 наблюдалось увеличение плотности экспрессии PDL1 базофилами у тяжелых больных, что позволило рассматривать данный показатель в качестве перспективного прогностического маркера тяжести течения заболевания. Более того, плотность PDL1 на базофилах положительно коррелировала с тяжестью течения заболевания, выраженной в единицах шкал WHO и SOFA [94].

Что же касается тучных клеток, то их участие в патогенезе COVID-19 может быть связано с выбросом различных провоспалительных медиаторов, высокий уровень которых может играть важную роль в повреждении ткани легких и активации различных иммунных и не иммунных клеток как в очаге воспаления, так и на системном уровне. Например, в образцах сыворотки крови от пациентов с COVID-19 были увеличены, по сравнению со здоровыми донорами, уровни специфичных для тучных клеток ферментов (химазы, β -триптазы и карбоксипептидазы А3), которые высвобождаются при секреторной дегрануляции [28]. Более того, повышение уровней этих ферментов было тесно связано с увеличением концентраций некоторых провоспалительных хемокинов (IP-10, CCL2 и CCL4), которые позволяли оценить тяжесть течения COVID-19. Кроме того, анализ биоптатов легочной ткани у пациентов с COVID-19 показал увеличение численности CD117⁺ тучных клеток и IL-4-экспрессирующих клеток в периваскулярном пространстве и альвеолярных септах по сравнению с контролем [72]. Столь массовая активация тучных клеток, а также их накопление в очагах воспаления позволяют, по мнению некоторых исследователей, рассматривать эти клетки в качестве мишени для терапии при

остром течении COVID-19 [51]. Тогда как ограничение или блокада активации тучных клеток, связанная с секрецией медиаторов воспаления и продукцией провоспалительных цитокинов и хемокинов, может использоваться в клинической практике для уменьшения объема поражения легочной ткани [7].

Сниженное содержание эозинофилов в периферической крови было характерно для ~75% больных с COVID-19 [62]. Эозинопения могла рассматриваться в качестве предиктора тяжести COVID-19 и его последующего прогрессирования, тогда как возвращение уровня этих клеток к нормативным значениям являлось благоприятным признаком [100]. С другой стороны, у пациентов с эозинофилией отмечался более низкий уровень СРБ, более легкое клиническое течение и лучшие исходы заболевания по сравнению с пациентами без эозинофилии [74]. Столь же важно отметить и тот факт, что уровни эозинофилов в циркуляции были значительно ниже у пациентов с критическим течением COVID-19 по сравнению с пациентами со средним и тяжелым течением [101]. В целой серии работ была отмечена взаимосвязь между эозинофилией и легкой формой течения COVID-19, что указывает на важную роль этих клеток в ограничении воспаления при данном инфекционном процессе [21, 79]. Можно предполагать, что развитие воспалительного процесса по 2 типу, связанное с увеличением Th2 и эозинофилов в периферической крови, может рассматриваться в качестве благоприятного прогностического фактора. Более того, имеются свидетельства того, что Th2 и эозинофилы посредством секреции цитокинов (в первую очередь, IL-13) способны снижать уровень экспрессии ACE2 на эпителиальных клетках — ключевых мишенях для вируса SARS-COV-2 [52], что также подтверждается клиническими наблюдениями за пациентами с респираторными заболеваниями [48].

T-хелперы 17 и их клетки-мишени при COVID-19

Клеточный иммунный ответ по 3 типу (Th17 и ILC17), направленный на элиминацию внеклеточных бактерий и грибов, характеризуется притоком из периферической крови в воспаленную ткань нейтрофилов, а также активацией клеток барьерных тканей (в первую очередь, эпителиоцитов слизистых оболочек) с увеличением продукции слизи и антимикробных защитных факторов [108]. При проникновении патогенов активируются миелоидные дендритные клетки (mDC2) для выработки IL-1 β , IL-6 и IL-23, вызывающие активацию ILC3 и «поля-

ризации» «наивных» Т-хелперов в сторону Th17. Следует отметить, что уровень этих ключевых поляризационных цитокинов (IL-1 β и IL-6) особенно повышается в острой фазе инфекционного процесса, вызванного SARS-CoV-2, что может служить дополнительными маркерами тяжести течения заболевания [82]. Главными эффекторными цитокинами Th17 являются белки семейства IL-17 (в первую очередь, IL-17A), регулирующие функции нейтрофилов и их привлечение в очаг воспаления, и IL-22, основной функцией которого является активация защитных свойств клеток эпителиальных пластов, причем именно IL-17A [86], и IL-22 [7] могут играть важную роль в патогенезе COVID-19 и рассматриваться в качестве мишеней для терапии данного заболевания.

При анализе субпопуляционного состава Th-клеток при COVID-19 было отмечено снижение доли Th17.1 и Th1-лимфоцитов, способных к продукции IFN γ , а также некоторое уменьшение уровня Treg в циркуляции [59]. Более того, в ответ на стимуляцию *in vitro* Т-хелперы пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, накапливали IL-17A и IL-2 более эффективно, чем клетки аналогичной популяции группы сравнения [23]. Вместе с тем, в упомянутой выше работе было отмечено снижение доли Т-хелперов, несущих на своей поверхности ключевые антигены Th17 — CD161 и CCR6, тогда как содержание клеток, экспрессировавших маркеры Th2 (CCR4 и GATA3), было достоверно выше, чем в контроле. Сходные результаты были получены при помощи молекулярно-биологических методов исследования, когда было показано, что в CD4⁺ Т-лимфоцитах периферической крови больных с тяжелым течением COVID-19 снижалась экспрессия Th17-ассоциированных генов на примере RORC, IL17A, IL17F и CCR6 [47]. Минимальный уровень Th17 отмечался у пациентов с тяжелым течением COVID-19 [31]. Общий пул Th17 на основании анализа коэкспрессии хемокиновых рецепторов CCR4 и CXCR3 можно разделить на несколько независимых субпопуляций [4]. Так, в рамках общего пула CCR6⁺ Th17 именно у тяжелых больных отмечалось снижение доли CCR4⁺CXCR3⁺ Th17.1-клеток и увеличение CCR4⁺CXCR3⁻ «классических» Th17 [31]. Однако, в рамках другого исследования было показано, что в периферической крови больных COVID-19 отмечалось увеличение доли Th17 и фолликулярных Т-клеток на фоне некоторого снижения Th1, а значения, полученные для Th2 и Th17.1, не отличались от группы контроля [84]. Можно предполагать, что Th17 в острой фазе инфекционного процесса покидали кровотоки и мигрировали в воспаленную ткань легкого, где продуцировали широкий

спектр провоспалительных цитокинов, способных вызывать воспаление и повреждение окружающих тканей при помощи различных механизмов. Действительно, при анализе ЖБАЛ, которые указывают на накопление в тканях пораженных легких Th17 с «провоспалительным» фенотипом [105]. Так, эти Th17 обладали фенотипом тканевых резидентных Т-клеток памяти, экспрессировали гены, связанные с цитолитическими свойствами (SRGN, GZMB и GNLY), и гены цитокинов IL-21, IL-17F, IL-17A, IFN γ и GM-CSF [105]. Более того, ткани легких больных COVID-19 были обогащены клетками, коэкспрессировавшими CCR6 и IL17A, а в жидкой фазе ЖБАЛ обнаруживались высокие концентрации IL-6, IL-17A, GM-CSF, IFN γ и IL-8.

Главными клетками-мишенями для Th17 являлись нейтрофилы, увеличение уровня которых в циркуляции являлось одним из важнейших признаков воспалительного процесса при COVID-19 [43, 104]. Так, повышение уровня этих клеток в циркуляции в совокупности с некоторыми другими рутинными клиническими тестами позволяет отличить пациентов в критическом состоянии от пациентов с тяжелым течением заболевания уже на ранних этапах развития инфекции [9]. Еще одним из потенциальных маркеров COVID-19 является появление в периферической крови больных со средним и тяжелым течением заболевания незрелых форм нейтрофилов [67]. По мере увеличения тяжести заболевания относительное содержание CD16⁺CD11b^{hi}-нейтрофилов в рамках общей лейкоцитарной популяции возрастало. С другой стороны, в периферической крови и легких пациентов с COVID-19 отмечалось накопление незрелых нейтрофилов с фенотипом CD10^{low}CD101⁻CXCR4^{+/-}, обладавших выраженными супрессорными свойствами [87]. Кроме того, для пациентов с легким течением отмечено увеличение доли CD10^{low}CD101⁺-нейтрофилов в периферической крови, тогда как у тяжелых пациентов возрастала CD10^{low}CD101⁻ популяция нейтрофилов. И, наконец, нейтрофилы пациентов с тяжелым течением заболевания в ответ на стимуляцию *in vitro* менее эффективно продуцировали активные формы кислорода, хотя их фагоцитарная активность не была снижена при сравнении с клетками аналогичной популяции, полученных от больных с легким течением COVID-19 [67, 87]. Более того, незрелые CD16^{low}-нейтрофилы пациентов с тяжелым течением COVID-19 могли содержать Ki67 [18], что указывало на недавнее прохождение митотического цикла этими клетками. В рамках другого исследования была показана значимость анализа соотношений нейтро-

филы/ $CD3^+CD8^+$ и нейтрофилы/лимфоциты как прогностических факторов тяжелой формы течения COVID-19 при достижении значений более 21,9 и более 5,0 соответственно [64]. Кроме того, была обнаружена зависимость между значением соотношения нейтрофилы/лимфоциты и тяжестью течения COVID-19, выраженной в баллах шкалы APACHE III [57].

Фолликулярные Т-хелперы и В-лимфоциты при COVID-19

При развитии специфического гуморального ответа антиген-специфические антитела продуцируют В-лимфоциты, которые одновременно являются антиген-презентирующими клетками и эффекторными клетками [22]. В свою очередь, для формирования пула фолликулярных Т-хелперов человека из Th0 необходимы $sDC2$ и клетки Лангерганса, а также наличие в составе микроокружения активина А, IL-12 и/или TGF β , хотя точные механизмы «поляризации» данного типа Т-хелперов еще до конца не исследованы [26]. Однако именно Tfh играют важнейшую роль в созревании и дифференцировке В-клеток в рамках реакции зародышевого центра в периферических лимфоидных органах [93]. Эти клетки осуществляют контроль процессов переключения классов синтезируемых В-клеткой антител, запуска соматических гипермутаций, селекции высокоаффинных клонов В-клеток, которые в дальнейшем дифференцируются в плазматические клетки и клетки памяти [12, 53]. Уровень циркулирующих Tfh при COVID-19 мог снижаться вне зависимости от тяжести течения заболевания [38], хотя в некоторых работах отмечается отсутствие различий между здоровыми добровольцами и больными COVID-19 [57] или увеличение доли Tfh в циркуляции [84], которые могли быть тесно связаны с тяжестью течения, достигая минимальных значений у пациентов с тяжелым COVID-19 [31]. Более того, подобного рода нарушения могли носить длительный характер и могли быть связаны с увеличением $CXCR5^+PD-1^{high}CD4^+$ Tfh и $CCR7^{lo}PD-1^+$ фолликулярных клеток эффекторной памяти (Tfh-em) и снижением количества $CCR7^{hi}PD-1^-$ фолликулярных клеток центральной памяти (Tfh-st), способных к миграции в лимфоидную ткань [32].

В большинстве работ отмечались изменения в субпопуляционном составе циркулирующих Tfh-клеток. Так, было выявлено достоверное повышение уровня активированных Tfh-клеток с фенотипом $CD38^+ICOS^+$ в пределах общего пула $CD45RA-PD-1^+CXCR5^+$ циркулирующих фолликулярных Т-хелперов памяти [69]. Было

показано, что в циркуляции у всех пациентов с COVID-19 доля $PD-1^+ICOS^+$ и $CD38^+HLA-DR^+$ -клеток возрастала среди $CXCR5^+CD4^+$ Tfh [88]. Следует отметить, что у переболевших COVID-19 уровень активированных Tfh также был достоверно выше такового у группы сравнения. Кроме того, в рамках общего пула циркулирующих Tfh пациентов с COVID-19 выявлялось достоверно большее число клеток, экспрессировавших Ki67 и оба активационных антигена CD38 и HLA-DR, чем в группе контроля [69]. В периферической крови пациентов в острый период COVID-19 отмечалось нарушение баланса между $CXCR3^+CCR6^-$ Tfh1-клетками, обладавшими «регуляторными» свойствами и способными подавлять гуморальный ответ, и $CXCR3-CCR6^-$ Tfh2 и $CXCR3-CCR6^+$ Tfh17, стимулировавшими развитие В-клеточного ответа [71], связанные со снижением доли «регуляторных» Tfh1 и увеличением «провоспалительных» Tfh17 [31].

Несмотря на высокий уровень активации Tfh, данные литературы свидетельствуют о низкой эффективности этих клеток в стимуляции гуморального ответа, связанной с нарушением формирования зародышевых центров в В-зависимых зонах лимфатических узлов, а также со снижением экспрессии ключевого транскрипционного фактора Bcl-6, отвечающего за реализацию функциональной активности Tfh [49]. Кроме того, результаты гистологических исследований указывают на атрофию герминативных центров В-зависимых зон в лимфатических узлах при остром заболевании. Вместе с тем, уровень циркулирующих Tfh-клеток, специфичных S-, N- или M-белкам, обладал положительной корреляцией с нейтрализующей активностью плазмы и уровнем N-специфических IgG [13]. У переболевших COVID-19 обнаруживались циркулирующие вирус-специфические $CD45RA-CXCR5^+$ Tfh, способные к распознаванию S-белка, тогда как доля RBD-специфичных Tfh была крайне низкой [46]. Более того, подавляющее большинство SARS-CoV-2-специфичных Tfh-клеток относилось $CCR6^+CXCR3^-$ Tfh17, однако часть этих клеток обладала фенотипом Tfh1 ($CCR6^-CXCR3^+$). У выздоровевших пациентов, чья плазма имела высокую нейтрализующую способность, отмечалось высокое количество $sTfh1$ - и $sTfh2$ -клеток, высокие уровни которых положительно коррелировали с нейтрализующей активностью сыворотки крови у переболевших субъектов [46].

Интересно отметить, что в периферической крови пациентов, перенесших COVID-19, уровень Tfh мог оставаться повышенным на протяжении нескольких месяцев после выздоровления, что было тесно связано с увеличением

доли Tfh2- и Tfh17-клеток [54]. Сходные результаты были получены Gong и соавторами, отметившими увеличение доли CXCR3⁺CCR6⁻ Tfh1- и CXCR3⁻CCR6⁻ Tfh2-клеток по сравнению с контролем, тогда как уровень CXCR3⁻CCR6⁺ Tfh17 был достоверно снижен [32]. Также у этой группы пациентов отмечалось снижение в циркуляции CD45RA⁻CD127⁻CD25⁺CXCR5^{hi}PD-1^{hi} регуляторных Tfh относительно здоровых добровольцев.

Столь существенные изменения в субпопуляционном составе Tfh-клеток и их функциональной активности при COVID-19 должны быть тесно связаны с нарушениями в дифференцировке и активации В-клеток. Так, содержание В-клеток у пациентов с COVID-19 в периферической крови было снижено относительно контрольных показателей по результатам некоторых исследований [23, 67]. В первую очередь, это снижение было особенно заметно у тяжелых пациентов по сравнению с пациентами с легкой и средней степенью заболевания [67]. Следует отметить, что в циркуляции были снижены практически все основные субпопуляции В-лимфоцитов, к числу которых относились как «наивные» В-клетки, так и В-клетки памяти с переключенным и непереключенным классом синтезируемых антител [23]. С другой стороны, отмечалось увеличение доли эффекторных клеток — циркулирующих предшественников плазматических клеток или плазмобластов с фенотипом CD27^{hi}CD38^{hi}CD24⁻ [23, 49, 67]. При COVID-19 эти В-клетки содержали в составе цитоплазмы не только высокие уровни Ki67, что указывало на недавнее прохождение митотического цикла, но и экспрессировали на своей мембране маркер активации CD95, что могло указывать на недавнюю эмиграцию В-клеток из зародышевых центров лимфоидной ткани [69]. Среди циркулирующих плазмобластов в достаточном количестве встречались RBD-специфичные клетки даже в остром периоде инфекционного процесса, что еще раз указывает на эффективность формирования нейтрализующих антител [15]. С другой стороны, уровень IgM⁺- и IgM⁻-плазмобластов и «дважды негативных» В-клеток памяти (CD27⁻IgD⁻) при COVID-19 значительно увеличивался [23]. Более того, в рамках этой популяции клеток у пациентов с тяжелым течением заболевания растет доля DN IgD⁻CD27⁻CXCR5⁻, не способных проникать в В-зависимые зоны и участвовать в развитие повторного ответа на антиген [49]. Присутствие в циркуляции у пациентов с COVID-19 увеличенного числа DN В-клеток может указывать на «экстрафолликулярные» механизмы развития специфического гуморального ответа, который может являться до-

минирующим у пациентов с тяжелым течением данного заболевания [49, 99]. По-видимому, в этом случае имеет место гиперактивация В-клеток, что, по мнению авторов, выражается в повышении уровня CD11c⁺CD21⁻ DN2 и предшественников плазматических клеток с фенотипом CD27⁺CD38^{hi}, равно как и является неблагоприятным признаком исхода заболевания [99].

На нарушение процессов дифференцировки В-клеток указывает еще и то, что у пациентов с тяжелым течением COVID-19 в периферической крови снижалось относительное и абсолютное содержания общего пула В-клеток, а также «наивных» IgD⁺CD27⁻ клеток, переходных IgD⁺CD27⁻CD10⁺CD45RB⁻ и фолликулярных CXCR5⁺ (IgD⁺CD27⁻CD10⁻CD73⁺) В-лимфоцитов по сравнению с контролем и выздоровевшими пациентами [49]. Еще одним признаком, указывающим на нарушения в процессах созревания и дифференцировки эффекторных В-клеток, является выход в циркулирующую кровь CD21-негативных В-лимфоцитов, которые не способны эффективно проводить сигнал на активацию от В-клеточного рецептора при взаимодействии с антигеном [57, 99]. Так, у пациентов с легким и тяжелым течением COVID-19 в циркуляции уровень CD21⁺CD27⁻-клеток был снижен относительно контроля, тогда как доля CD21⁻CD27⁻-клеток достоверно возрастала [57]. С другой стороны, CD21^{low} В-лимфоцитов могут рассматриваться в качестве клеток, которые только что покинули зародышевый центр и являются предшественниками плазматических клеток [60]. В этом случае накопление CD21-негативных В-клеток в крови может быть тесно связано с интенсивными процессами созревания в лимфоидной ткани. Еще одним признаком, позволяющим предположить наличие серьезных нарушений в функционировании В-клеток при COVID-19, является резкое снижение уровня экспрессии CXCR5 — хемокинового рецептора, отвечающего за миграцию В-клеток в В-зависимые зоны периферических лимфоидных органов ткани [49, 69]. Снижение доли CXCR5⁺-клеток у пациентов с COVID-19 было отмечено во всех субпопуляциях циркулирующих В-клеток, включая «наивные» (IgD⁺CD27⁻), клетки памяти, не переключившие (IgD⁺CD27⁺) и переключившие (IgD⁻CD27⁺) класс синтезируемых антител, а также CD27⁻IgD⁻ и CD27⁺CD38⁺ плазмобласты.

Приведенные данные указывают на существенные нарушения в механизмах запуска и регуляции специфического гуморального иммунного ответа, которые затрагивают не только основы функционирования В-лимфоцитов как главных эффекторных клеток, но и фолли-

кулярные Т-хелперы, которые, по-видимому, в острой фазе COVID-19 не могут эффективно выполнять свои функции, связанные с контролем за антигенной специфичностью формирующихся антител.

Заключение

Пандемия COVID-19 уже продолжается около двух лет, и наши представления об остром течении инфекционного процесса, вызванного SARS-CoV-2, расширяются с каждым месяцем. Вместе с тем, анализ состояния клеток иммунной системы в острой фазе заболевания, а также наблюдения за теми изменениями, которые сохраняются в функционировании иммунной системы переболевших пациентов, позволяют предполагать наличие отдаленных или «постковидных» осложнений [44, 56]. Например, гиперактивация Th17 и нарушения их субпопуляционного состава, изменения соотношения «регуляторных» и «провоспалительных» Tfh-клеток, а также снижение контроля за антитело-продуцирующими В-клетками весьма схожи с изменениями, характерными для широ-

кого спектра аутоиммунных патологий [25, 66], заболеваемость которыми резко возрастает после COVID-19 [78]. Долговременные нарушения в процессах созревания и дифференцировки НК-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, наличием на их поверхности ингибиторных рецепторов или маркеров «клеточного старения», что сопровождается, в первую очередь, низкой эффективностью уничтожения клеток-мишеней, могут снижать эффективность противоопухолевого и противовирусного иммунитета [33, 91]. Кроме того, гиперактивация тканевых макрофагов, формирование пула активированных мигрировавших из кровотока моноцитов на фоне цитокинового «шторма» и изменение баланса между Т-хелперами разных популяций (Th1/Th2 и Th17/Treg) в очаге воспаления вносят свой вклад в нарушение процессов регенерации воспаленной ткани различной локализации и развитие фиброза [37, 73]. Таким образом, исследование патогенеза COVID-19 и определение роли иммунной системы в «постковидных» нарушениях работы всего организма в ближайшие годы останутся актуальными.

Список литературы/References

1. Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Бацунов О.К., Коробова З.Р., Станевич О.В., Лебедева А.А., Воробьев Е.А., Воробьева С.В., Куликов А.Н., Лиознов Д.А., Шарапова М.А., Певцов Д.Э., Тотолян А.А. Цитокины в плазме крови больных COVID-19 в острой фазе заболевания и фазе полного выздоровления // Медицинская иммунология. 2021. Т. 23, № 2. С. 311–326. [Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Lioznov D.A., Sharapova M.A., Pevtcov D.E., Totolian A.A. Plasma cytokines in patients with COVID-19 during acute phase of the disease and following complete recovery. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, vol. 23, no. 2, pp. 311–326 (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2312
2. Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Носков А.К. Роль клеточного звена иммунитета в формировании иммунного ответа при коронавирусных инфекциях // Медицинская иммунология. 2021. Т. 23, № 6. С. 1229–1238. [Ivanova I.A., Omelchenko N.D., Filippenko A.V., Trufanova A.A., Noskov A.K. Role of the cellular immunity in the formation of the immune response in coronavirus infections. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, vol. 23, no. 6, pp. 1229–1238. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-ROT-2302
3. 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. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, vol. 20, no. 2, pp. 227–240. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-227-240
4. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян А.А. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 3. С. 239–250. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebriakova M.K., Totolian A.A. Chemokine receptors at distinct differentiation stages of T-helpers from peripheral blood. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 3, pp. 239–250. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-239-250
5. Лядова И.В., Стариков А.А. COVID-19 и вакцинация БЦЖ: есть ли связь? // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 3. С. 459–468. [Lyadova I.V., Starikov A.A. COVID-19 and BCG vaccine: is there a link? *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 3, pp. 459–468. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-CAB-1472
6. Смирнов В.С., Тотолян А.А. Врожденный иммунитет при коронавирусной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 259–268. [Smirnov V.S., Totolian A.A. Innate immunity in coronavirus infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 259–268. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-111-1440
7. Afrin L.B., Weinstock L.B., Molderings G.J. Covid-19 hyperinflammation and post-Covid-19 illness may be rooted in mast cell activation syndrome. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 100, pp. 327–332. doi: 10.1016/j.ijid.2020.09.016
8. Alcorn J.F. IL-22 plays a critical role in maintaining epithelial integrity during pulmonary infection. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11: 1160. doi: 10.3389/fimmu.2020.01160

9. Amer S.A., Albeladi O.A., Elshabrawy A.M., Alsharief N.H., Alnakhli F.M., Almugathai A.F., Almashahadi S.S., Dawood H.M., Malik M.B., Shah J., Aiash H. Role of neutrophil to lymphocyte ratio as a prognostic indicator for COVID-19. *Health Sci. Rep.*, 2021, vol. 4, no. 4: e442. doi: 10.1002/hsr2.442
10. Annunziato F., Romagnani C., Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, vol. 135, no. 3, pp. 626–635. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.001
11. Bakin E.A., Stanevich O.V., Chmelevsky M.P., Belash V.A., Belash A.A., Savateeva G.A., Bokinova V.A., Arsentieva N.A., Sayenko L.F., Korobkov E.A., Lioznov D.A., Totolian A.A., Polushin Y.S., Kulikov A.N. A novel approach for COVID-19 patient condition tracking: from instant prediction to regular monitoring. *Front. Med. (Lausanne)*, 2021, vol. 8: 744652. doi: 10.3389/fmed.2021.744652
12. Bonecchi R., Bianchi G., Bordignon P.P., D'Ambrosio D., Lang R., Borsatti A., Sozzani S., Allavena P., Gray P.A., Mantovani A., Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 187, no. 1, pp. 129–134. doi: 10.1084/jem.187.1.129
13. Boppana S., Qin K., Files J.K., Russell R.M., Stoltz R., Bibollet-Ruche F., Bansal A., Erdmann N., Hahn B.H., Goepfert P.A. SARS-CoV-2-specific circulating T follicular helper cells correlate with neutralizing antibodies and increase during early convalescence. *PLoS Pathog.*, 2021, vol. 17, no. 7: e1009761. doi: 10.1371/journal.ppat.1009761
14. Braun J., Loyal L., Frentsch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., Hippenstiel S., Dingeldey M., Kruse B., Fauchere F., Baysal E., Mangold M., Henze L., Lauster R., Mall M.A., Beyer K., Röhmel J., Voigt S., Schmitz J., Miltenyi S., Demuth I., Müller M.A., Hocke A., Witzernath M., Suttrop N., Kern F., Reimer U., Wenschuh H., Drosten C., Corman V.M., Giesecke-Thiel C., Sander L.E., Thiel A. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*, 2020, vol. 587, no. 7833, pp. 270–274. doi: 10.1038/s41586-020-2598-9
15. Byazrova M., Yusubaliev G., Spiridonova A., Efimov G., Mazurov D., Baranov K., Baklaushev V., Filatov A. Pattern of circulating SARS-CoV-2-specific antibody-secreting and memory B-cell generation in patients with acute COVID-19. *Clin. Transl. Immunology*, 2021, vol. 10, no. 2: e1245. doi: 10.1002/cti2.1245
16. Cai H., Liu G., Zhong J., Zheng K., Xiao H., Li C., Song X., Li Y., Xu C., Wu H., He Z., Zhu Q. Immune checkpoints in viral infections. *Viruses*, 2020, vol. 12, no. 9: 1051. doi: 10.3390/v12091051
17. Chen G., Wu D., Guo W., Cao Y., Huang D., Wang H., Wang T., Zhang X., Chen H., Yu H., Zhang X., Zhang M., Wu S., Song J., Chen T., Han M., Li S., Luo X., Zhao J., Ning Q. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J. Clin. Invest.*, 2020, vol. 130, no. 5, pp. 2620–2629. doi: 10.1172/JCI1137244
18. Chevrier S., Zurbuchen Y., Cervia C., Adamo S., Raebler M.E., de Souza N., Sivapatham S., Jacobs A., Bachli E., Rudiger A., Stüssi-Helbling M., Huber L.C., Schaer D.J., Nilsson J., Boyman O., Bodenmiller B. A distinct innate immune signature marks progression from mild to severe COVID-19. *Cell Rep. Med.*, 2020, vol. 2, no. 1: 100166. doi: 10.1016/j.xcrim.2020.100166
19. Chua R.L., Lukassen S., Trump S., Hennig B.P., Wendisch D., Pott F., Debnath O., Thürmann L., Kurth F., Völker M.T., Kazmierski J., Timmermann B., Twardziok S., Schneider S., Machleidt F., Müller-Redetzky H., Maier M., Krannich A., Schmidt S., Balzer F., Liebig J., Loske J., Suttrop N., Eils J., Ishaque N., Liebert U.G., von Kalle C., Hocke A., Witzernath M., Goffinet C., Drosten C., Laudi S., Lehmann I., Conrad C., Sander L.E., Eils R. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat. Biotechnol.*, 2020, vol. 38, no. 8, pp. 970–979. doi: 10.1038/s41587-020-0602-4
20. Collin M., Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, 2018, vol. 154, pp. 3–20. doi:10.1111/imm.12888
21. Cortés-Vieyra R., Gutiérrez-Castellanos S., Álvarez-Aguilar C., Baizabal-Aguirre V.M., Nuñez-Anita R.E., Rocha-López A.G., Gómez-García A. Behavior of eosinophil counts in recovered and deceased COVID-19 patients over the course of the disease. *Viruses*, 2021 vol. 13, no. 9: 1675. doi: 10.3390/v13091675
22. Crotty S. T follicular helper cell biology: a decade of discovery and diseases. *Immunity*, 2019, vol. 50, no. 5, pp. 1132–1148. doi: 10.1016/j.immuni.2019.04.011
23. De Biasi S., Meschiari M., Gibellini L., Bellinazzi C., Borella R., Fidanza L., Gozzi L., Iannone A., Lo Tartaro D., Mattioli M., Paolini A., Menozzi M., Milić J., Franceschi G., Fantini R., Tonelli R., Sita M., Sarti M., Trenti T., Brugioni L., Cicchetti L., Facchinetti F., Pietrangelo A., Clini E., Girardis M., Guaraldi G., Mussini C., Cossarizza A. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat. Commun.*, 2020, vol. 11, no. 1: 3434. doi: 10.1038/s41467-020-17292-4
24. Demaria O., Carvelli J., Batista L., Thibult M.L., Morel A., André P., Morel Y., Vély F., Vivier E. Identification of druggable inhibitory immune checkpoints on natural killer cells in COVID-19. *Cell Mol. Immunol.*, 2020, vol. 17, no. 9, pp. 995–997. doi: 10.1038/s41423-020-0493-9
25. Dewanjee S., Kandimalla R., Kalra R.S., Valupadas C., Vallamkondu J., Kolli V., Dey Ray S., Reddy A.P., Reddy P.H. COVID-19 and rheumatoid arthritis crosstalk: emerging association, therapeutic options and challenges. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 12: 3291. doi: 10.3390/cells10123291
26. Durand M., Walter T., Pirnay T., Naessens T., Gueguen P., Goudot C., Lameiras S., Chang Q., Talaei N., Ornatsky O., Vassilevskaia T., Baulande S., Amigorena S., Segura E. Human lymphoid organ cDC2 and macrophages play complementary roles in T follicular helper responses. *J. Exp. Med.*, 2019, vol. 216, no. 7, pp. 1561–1581. doi: 10.1084/jem.20181994
27. Eberl G. Immunity by equilibrium. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, vol. 16, no. 8, pp. 524–532. doi: 10.1038/nri.2016.75
28. Gebremeskel S., Schanin J., Coyle K.M., Butuci M., Luu T., Brock E.C., Xu A., Wong A., Leung J., Korver W., Morin R.D., Schleimer R.P., Bochner B.S., Youngblood B.A. Mast cell and eosinophil activation are associated with COVID-19 and TLR-mediated viral inflammation: implications for an anti-siglec-8 antibody. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 650331. doi: 10.3389/fimmu.2021.650331
29. Giamarellos-Bourboulis E.J., Netea M.G., Rovina N., Akinosoglou K., Antoniadou A., Antonakos N., Damoraki G., Gkavogianni T., Adami M.E., Katsaounou P., Ntaganou M., Kyriakopoulou M., Dimopoulos G., Koutsodimitropoulos I.,

- Velissaris D., Koufargyris P., Karageorgos A., Katrini K., Lekakis V., Lupse M., Kotsaki A., Renieris G., Theodoulou D., Panou V., Koukaki E., Koulouris N., Gogos C., Koutsoukou A. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host Microbe*, 2020, vol. 27, no. 6, pp. 992–1000.e3. doi: 10.1016/j.chom.2020.04.009
30. Gil-Etayo F.J., Suárez-Fernández P., Cabrera-Marante O., Arroyo D., Garcinuño S., Naranjo L., Pleguezuelo D.E., Allende L.M., Mancebo E., Lalueza A., Díaz-Simón R., Paz-Artal E., Serrano A. T-helper cell subset response is a determining factor in COVID-19 progression. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2021, vol. 11: 624483. doi: 10.3389/fcimb.2021.624483
31. Golovkin A., Kalinina O., Bezrukikh V., Aquino A., Zaikova E., Karonova T., Melnik O., Vasilieva E., Kudryavtsev I. Imbalanced immune response of T-cell and B-cell subsets in patients with moderate and severe COVID-19. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 10: 1966. doi: 10.3390/v13101966
32. Gong F., Dai Y., Zheng T., Cheng L., Zhao D., Wang H., Liu M., Pei H., Jin T., Yu D., Zhou P. Peripheral CD4⁺ T cell subsets and antibody response in COVID-19 convalescent individuals. *J. Clin. Invest.*, 2020, vol. 130, no. 12, pp. 6588–6599. doi: 10.1172/JCI141054
33. Gosain R., Abdou Y., Singh A., Rana N., Puzanov I., Ernst M.S. COVID-19 and cancer: a comprehensive review. *Curr. Oncol. Rep.*, 2021, vol. 22, no. 5, pp. 53. doi: 10.1007/s11912-020-00934-7
34. Grifoni A., Sidney J., Vita R., Peters B., Crotty S., Weiskopf D., Sette A. SARS-CoV-2 human T cell epitopes: adaptive immune response against COVID-19. *Cell Host Microbe*, 2021, vol. 29, no. 7, pp. 1076–1092. doi: 10.1016/j.chom.2021.05.010
35. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jardi R.S., Marrama D., de Silva A.M., Frazier A., Carlin A.F., Greenbaum J.A., Peters B., Krammer F., Smith D.M., Crotty S., Sette A. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*, 2020, vol. 181, no. 7, pp. 1489–1501.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015
36. Guilliams M., Ginhoux F., Jakubczak C., Naik S.H., Onai N., Schraml B.U., Segura E., Tussiwand R., Yona S. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, vol. 14, no. 8, pp. 571–578. doi: 10.1038/nri3712
37. Guizani I., Fourti N., Zidi W., Feki M., Allal-Elasmi M. SARS-CoV-2 and pathological matrix remodeling mediators. *Inflamm. Res.*, 2021, vol. 70, no. 8, pp. 847–858. doi: 10.1007/s00011-021-01487-6
38. Gutiérrez-Bautista J.F., Rodríguez-Nicolas A., Rosales-Castillo A., Jiménez P., Garrido F., Anderson P., Ruiz-Cabello F., López-Ruz M.Á. Negative clinical evolution in COVID-19 patients is frequently accompanied with an increased proportion of undifferentiated Th cells and a strong underrepresentation of the Th1 subset. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11: 596553. doi: 10.3389/fimmu.2020.596553
39. Hou H., Zhang Y., Tang G., Luo Y., Liu W., Cheng C., Jiang Y., Xiong Z., Wu S., Sun Z., Xu S., Fan X., Wang F. Immunologic memory to SARS-CoV-2 in convalescent COVID-19 patients at 1 year postinfection. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, vol. 148, no. 6, pp. 1481–1492.e2. doi: 10.1016/j.jaci.2021.09.008
40. Hou Y., Zhao J., Martin W., Kallianpur A., Chung M.K., Jehi L., Sharifi N., Erzurum S., Eng C., Cheng F. New insights into genetic susceptibility of COVID-19: an ACE2 and TMPRSS2 polymorphism analysis. *BMC Med.*, 2020, vol. 18, no. 1: 216. doi: 10.1186/s12916-020-01673-z
41. Hume D.A., Irvine K.M., Pridans C. The mononuclear phagocyte system: the relationship between monocytes and macrophages. *Trends Immunol.*, 2019, vol. 40, no. 2, pp. 98–112. doi: 10.1016/j.it.2018.11.007
42. Iwamura A.P.D., Tavares da Silva M.R., Hümmelgen A.L., Soeiro Pereira P.V., Falcai A., Grumach A.S., Goudouris E., Neto A.C., Prando C. Immunity and inflammatory biomarkers in COVID-19: a systematic review. *Rev. Med. Virol.*, 2021, vol. 31, no. 4: e2199. doi: 10.1002/rmv.2199
43. Izcovich A., Ragusa M.A., Tortosa F., Lavena Marzio M.A., Agnoletti C., Bengolea A., Ceirano A., Espinosa F., Saavedra E., Sanguine V., Tassara A., Cid C., Catalano H.N., Agarwal A., Foroutan F., Rada G. Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: a systematic review. *PLoS One*, 2020, vol. 15, no. 11: e0241955. doi: 10.1371/journal.pone.0241955
44. Jennings G., Monaghan A., Xue F., Mockler D., Romero-Ortuño R. A systematic review of persistent symptoms and residual abnormal functioning following acute COVID-19: ongoing symptomatic phase vs. post-COVID-19 syndrome. *J. Clin. Med.*, 2021, vol. 10, no. 24: 5913. doi: 10.3390/jcm10245913
45. Jiang Y., Wei X., Guan J., Qin S., Wang Z., Lu H., Qian J., Wu L., Chen Y., Chen Y., Lin X. COVID-19 pneumonia: CD8⁺ T and NK cells are decreased in number but compensatory increased in cytotoxic potential. *Clin. Immunol.*, 2020, vol. 218: 108516. doi: 10.1016/j.clim.2020.108516
46. Juno J.A., Tan H.X., Lee W.S., Reynaldi A., Kelly H.G., Wragg K., Esterbauer R., Kent H.E., Batten C.J., Mordant F.L., Gherardin N.A., Pymm P., Dietrich M.H., Scott N.E., Tham W.H., Godfrey D.I., Subbarao K., Davenport M.P., Kent S.J., Wheatley A.K. Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. *Nat. Med.*, 2020, vol. 26, no. 9, pp. 1428–1434. doi: 10.1038/s41591-020-0995-0
47. Kalfaoglu B., Almeida-Santos J., Tye C.A., Satou Y., Ono M. T-cell hyperactivation and paralysis in severe COVID-19 infection revealed by single-cell analysis. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11: 589380. doi: 10.3389/fimmu.2020.589380
48. Kanannejad Z., Alyasin S., Esmailzadeh H., Nabavizadeh H., Amin R. Asthma and COVID-19 pandemic: focused on the eosinophil count and ACE2 expression. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.*, 2021. doi: 10.23822/EurAnnACI.1764-1489.233
49. Kaneko N., Kuo H.H., Boucau J., Farmer J.R., Allard-Chamard H., Mahajan V.S., Piechocka-Trocha A., Lefteri K., Osborn M., Bals J., Bartsch Y.C., Bonheur N., Caradonna T.M., Chevalier J., Chowdhury F., Diefenbach T.J., Einkauf K., Fallon J., Feldman J., Finn K.K., Garcia-Broncano P., Hartana C.A., Hauser B.M., Jiang C., Kaplonek P., Karpell M., Koscher E.C., Lian X., Liu H., Liu J., Ly N.L., Michell A.R., Rassadkina Y., Seiger K., Sessa L., Shin S., Singh N., Sun W., Sun X., Ticheli H.J., Waring M.T., Zhu A.L., Alter G., Li J.Z., Lingwood D., Schmidt A.G., Lichterfeld M., Walker B.D., Yu X.G., Padera R.F.Jr., Pillai S.; Massachusetts Consortium on Pathogen Readiness Specimen Working Group. Loss of Bcl-6-expressing T follicular helper cells and germinal centers in COVID-19. *Cell*, 2020, vol. 183, no. 1, pp. 143–157.e13. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.025

50. Kang C.K., Han G.C., Kim M., Kim G., Shin H.M., Song K.H., Choe P.G., Park W.B., Kim E.S., Kim H.B., Kim N.J., Kim H.R., Oh M.D. Aberrant hyperactivation of cytotoxic T-cell as a potential determinant of COVID-19 severity. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 97, pp. 313–321. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.106
51. Kempuraj D., Selvakumar G.P., Ahmed M.E., Raikwar S.P., Thangavel R., Khan A., Zaheer S.A., Iyer S.S., Burton C., James D., Zaheer A. COVID-19, mast cells, cytokine storm, psychological stress, and neuroinflammation. *Neuroscientist*, 2020, vol. 26, no. 5–6, pp. 402–414. doi: 10.1177/1073858420941476
52. Kimura H., Francisco D., Conway M., Martinez F.D., Vercelli D., Polverino F., Billheimer D., Kraft M. Type 2 inflammation modulates ACE2 and TMPRSS2 in airway epithelial cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2020, vol. 146, no. 1, pp. 80–88.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2020.05.004
53. Koutsakos M., Lee W.S., Wheatley A.K., Kent S.J., Juno J.A. T follicular helper cells in the humoral immune response to SARS-CoV-2 infection and vaccination. *J. Leukoc. Biol.*, 2022, vol. 111, no. 2, pp. 355–365. doi: 10.1002/JLB.5MR0821-464R
54. Kudryavtsev I., Kalinina O., Bezrukikh V., Melnik O., Golovkin A. The significance of phenotyping and quantification of plasma extracellular vesicles levels using high-sensitivity flow cytometry during COVID-19 treatment. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 5: 767. doi: 10.3390/v13050767
55. Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Khamitova I.V., Isakov D.V., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Alterations in B cell and follicular T-helper cell subsets in patients with acute COVID-19 and COVID-19 convalescents. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2022, vol. 44, no. 1, pp. 194–205. doi: 10.3390/cimb44010014
56. Kunal S., Madan M., Tarke C., Gautam D.K., Kinkar J.S., Gupta K., Agarwal R., Mittal S., Sharma S.M. Emerging spectrum of post-COVID-19 syndrome. *Postgrad. Med. J.*, 2021. doi: 10.1136/postgradmedj-2020-139585
57. Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., Meng W., Rosenfeld A.M., Ittner C.A.G., Weisman A.R., Agyekum R.S., Mathew D., Baxter A.E., Vella L.A., Kuthuru O., Apostolidis S.A., Bershaw L., Dougherty J., Greenplate A.R., Pattekar A., Kim J., Han N., Gouma S., Weirick M.E., Arevalo C.P., Bolton M.J., Goodwin E.C., Anderson E.M., Hensley S.E., Jones T.K., Mangalmurti N.S., Luning Prak E.T., Wherry E.J., Meyer N.J., Betts M.R. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci. Immunol.*, 2020, vol. 5, no. 49: eabd7114. doi: 10.1126/sciimmunol.abd7114
58. Kvedaraitė E., Hertwig L., Sinha I., Ponzetta A., Hed Myrberg I., Lourda M., Dzidic M., Akber M., Klingström J., Folkesson E., Muvva J.R., Chen P., Gredmark-Russ S., Brighenti S., Norrby-Teglund A., Eriksson L.I., Rooyackers O., Aleman S., Strålin K., Ljunggren H.G., Ginhoux F., Björkström N.K., Henter J.I., Svensson M., Karolinska K.I.K. COVID-19 Study Group. Major alterations in the mononuclear phagocyte landscape associated with COVID-19 severity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2021, vol. 118, no. 6: e2018587118. doi: 10.1073/pnas.2018587118
59. Laing A.G., Lorenc A., Del Molino Del Barrio I., Das A., Fish M., Monin L., Muñoz-Ruiz M., McKenzie D.R., Hayday T.S., Francos-Quijorna I., Kamdar S., Joseph M., Davies D., Davis R., Jennings A., Zlatareva I., Vantourout P., Wu Y., Sofra V., Cano F., Greco M., Theodoridis E., Freedman J.D., Gee S., Chan J.N.E., Ryan S., Bugallo-Blanco E., Peterson P., Kisand K., Haljasmägi L., Chadli L., Moingeon P., Martinez L., Merrick B., Bisnauthsing K., Brooks K., Ibrahim M.A.A., Mason J., Lopez Gomez F., Babalola K., Abdul-Jawad S., Cason J., Mant C., Seow J., Graham C., Doores K.J., Di Rosa F., Edgeworth J., Shankar-Hari M., Hayday A.C. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat. Med.*, 2020, vol. 26, no. 10, pp. 1623–1635. doi: 10.1038/s41591-020-1038-6
60. Lau D., Lan L.Y., Andrews S.F., Henry C., Rojas K.T., Neu K.E., Huang M., Huang Y., DeKosky B., Palm A.E., Ippolito G.C., Georgiou G., Wilson P.C. Low CD21 expression defines a population of recent germinal center graduates primed for plasma cell differentiation. *Sci. Immunol.*, 2017, vol. 2, no. 7: eaai8153. doi: 10.1126/sciimmunol.aai8153
61. Leng Z., Zhu R., Hou W., Feng Y., Yang Y., Han Q., Shan G., Meng F., Du D., Wang S., Fan J., Wang W., Deng L., Shi H., Li H., Hu Z., Zhang F., Gao J., Liu H., Li X., Zhao Y., Yin K., He X., Gao Z., Wang Y., Yang B., Jin R., Stambler I., Lim L.W., Su H., Moskalev A., Cano A., Chakrabarti S., Min K.J., Ellison-Hughes G., Caruso C., Jin K., Zhao R.C. Transplantation of ACE2⁺ mesenchymal stem cells improves the outcome of patients with COVID-19 pneumonia. *Aging Dis.*, 2020, vol. 11, no. 2, pp. 216–228. doi: 10.14336/AD.2020.0228
62. Li Q., Ding X., Xia G., Chen H.G., Chen F., Geng Z., Xu L., Lei S., Pan A., Wang L., Wang Z. Eosinopenia and elevated C-reactive protein facilitate triage of COVID-19 patients in fever clinic: a retrospective case-control study. *EClinicalMedicine*, 2020, vol. 23: 100375. doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100375
63. Liao M., Liu Y., Yuan J., Wen Y., Xu G., Zhao J., Cheng L., Li J., Wang X., Wang F., Liu L., Amit I., Zhang S., Zhang Z. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat. Med.*, 2020, vol. 26, pp. 842–844. doi: 10.1038/s41591-020-0901-9
64. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., Li W., Tong Q., Yi J., Zhao L., Xiong L., Guo C., Tian J., Luo J., Yao J., Pang R., Shen H., Peng C., Liu T., Zhang Q., Wu J., Xu L., Lu S., Wang B., Weng Z., Han C., Zhu H., Zhou R., Zhou H., Chen X., Ye P., Zhu B., Wang L., Zhou W., He S., He Y., Jie S., Wei P., Zhang J., Lu Y., Wang W., Zhang L., Li L., Zhou F., Wang J., Dittmer U., Lu M., Hu Y., Yang D., Zheng X. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*, 2020, vol. 55: 102763. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102763
65. Malkova A., Kudlay D., Kudryavtsev I., Starshinova A., Yablonskiy P., Shoenfeld Y. Immunogenetic predictors of severe COVID-19. *Vaccines (Basel)*, 2021, vol. 9, no. 3: 211. doi: 10.3390/vaccines9030211
66. Malkova A., Kudryavtsev I., Starshinova A., Kudlay D., Zinchenko Y., Glushkova A., Yablonskiy P., Shoenfeld Y. Post COVID-19 syndrome in patients with asymptomatic/mild form. *Pathogens*, 2021, vol. 10, no. 11: 1408. doi: 10.3390/pathogens10111408
67. Mann E.R., Menon M., Knight S.B., Konkel J.E., Jagger C., Shaw T.N., Krishnan S., Rattray M., Ustianowski A., Bakerly N.D., Dark P., Lord G., Simpson A., Felton T., Ho L.P.; NIHR Respiratory TRC, Feldmann M., CIRCO, Grainger J.R., Hussels T. Longitudinal immune profiling reveals key myeloid signatures associated with COVID-19. *Sci Immunol.*, 2020, vol. 5, no. 51: eabd6197. doi: 10.1126/sciimmunol.abd6197

68. Martín-Sánchez E., Garcés J.J., Maia C., Inogés S., López-Díaz de Cerio A., Carmona-Torre F., Marin-Oto M., Alegre F., Molano E., Fernandez-Alonso M., Perez C., Botta C., Zabaleta A., Alcaide A.B., Landecho M.F., Rua M., Pérez-Warnisher T., Blanco L., Sarvide S., Vilas-Zornoza A., Alignedani D., Moreno C., Pineda I., Sogbe M., Argemi J., Paiva B., Yuste J.R. Immunological biomarkers of fatal COVID-19: a study of 868 patients. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 659018. doi: 10.3389/fimmu.2021.659018
69. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E., Oldridge D.A., Greenplate A.R., Wu J.E., Alanio C., Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., D'Andrea K., Manne S., Chen Z., Huang Y.J., Reilly J.P., Weisman A.R., Ittner C.A.G., Kuthuru O., Dougherty J., Nzingha K., Han N., Kim J., Pattekar A., Goodwin E.C., Anderson E.M., Weirick M.E., Gouma S., Arevalo C.P., Bolton M.J., Chen F., Lacey S.F., Ramage H., Cherry S., Hensley S.E., Apostolidis S.A., Huang A.C., Vella L.A., UPenn COVID Processing Unit, Betts M.R., Meyer N.J., Wherry E.J. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*, 2020, vol. 369, no. 6508: eabc8511. doi: 10.1126/science.abc8511
70. Maucourant C., Filipovic I., Ponzetta A., Aleman S., Cornillet M., Hertwig L., Strunz B., Lentini A., Reinius B., Brownlie D., Cuapio A., Ask E.H., Hull R.M., Haroun-Izquierdo A., Schaffer M., Klingström J., Folkesson E., Buggert M., Sandberg J.K., Eriksson L.I., Rooyackers O., Ljunggren H.G., Malmberg K.J., Michaëlsson J., Marquardt N., Hammer Q., Strålin K., Björkström N.K.; Karolinska COVID-19 Study Group. Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. *Sci. Immunol.*, 2020, vol. 5, no. 50: eabd6832. doi: 10.1126/sciimmunol.abd6832
71. Morita R., Schmitt N., Bentebibel S.E., Ranganathan R., Bourdery L., Zurawski G., Foucat E., Dullaers M., Oh S., Sabzghabaei N., Lavecchio E.M., Punaro M., Pascual V., Banchereau J., Ueno H. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*, 2011, vol. 34, no. 1, pp. 108–121. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.012
72. Motta Junior J.D.S., Miggiolaro A.F.R.D.S., Nagashima S., de Paula C.B.V., Baena C.P., Scharfstein J., de Noronha L. Mast cells in alveolar septa of COVID-19 patients: a pathogenic pathway that may link interstitial edema to immunothrombosis. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11: 574862. doi: 10.3389/fimmu
73. Mylvaganam R.J., Bailey J.L., Sznajder J.I., Sala M.A.; Northwestern Comprehensive COVID Center Consortium. Recovering from a pandemic: pulmonary fibrosis after SARS-CoV-2 infection. *Eur Respir Rev.*, 2021, vol. 30, no. 162: 210194. doi: 10.1183/16000617.0194-2021.73
74. Nair A.P., Soliman A., Al Masalamani M.A., De Sanctis V., Nashwan A.J., Sasi S., Ali E.A., Hassan O.A., Iqbal F.M., Yassin M.A. Clinical outcome of eosinophilia in patients with COVID-19: a controlled study. *Acta Biomed.*, 2020, vol. 91, no. 4: e2020165. doi: 10.23750/abm.v91i4.10564
75. Neidleman J., Luo X., Frouard J., Xie G., Gill G., Stein E.S., McGregor M., Ma T., George A.F., Kusters A., Greene W.C., Vasquez J., Ghosn E., Lee S., Roan N.R. SARS-CoV-2-specific T cells exhibit phenotypic features of helper function, lack of terminal differentiation, and high proliferation potential. *Cell Rep. Med.*, 2020, vol. 1, no. 6: 100081. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100081
76. Ni L., Ye F., Cheng M.L., Feng Y., Deng Y.Q., Zhao H., Wei P., Ge J., Gou M., Li X., Sun L., Cao T., Wang P., Zhou C., Zhang R., Liang P., Guo H., Wang X., Qin C.F., Chen F., Dong C. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity*, 2020, vol. 52, no. 6, pp. 971–977.e3. doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.023
77. Patente T.A., Pinho M.P., Oliveira A.A., Evangelista G.C.M., Bergami-Santos P.C., Barbuto J.A.M. Human dendritic cells: their heterogeneity and clinical application potential in cancer immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 9: 3176. doi: 10.3389/fimmu.2018.03176
78. Picchianti Diamanti A., Rosado M.M., Nicastrì E., Sesti G., Pioli C., Laganà B. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 infection and autoimmunity 1 year later: the era of vaccines. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 708848. doi: 10.3389/fimmu.2021.708848
79. Qeadan F., Chehade M., Tingey B., Egbert J., Dellon E.S., Peterson K.A. Patients with eosinophilic gastrointestinal disorders have lower in-hospital mortality rates related to COVID-19. *J. Allergy Clin. Immunol Pract.*, 2021, vol. 9, no. 12, pp. 4473–4476. e4. doi: 10.1016/j.jaip.2021.09.022
80. Rodriguez L., Pekkarinen P.T., Lakshmikanth T., Tan Z., Consiglio C.R., Pou C., Chen Y., Mugabo C.H., Nguyen N.A., Nowlan K., Strandin T., Levanov L., Mikes J., Wang J., Kantele A., Hepojoki J., Vapalahti O., Heinonen S., Kekäläinen E., Brodin P. Systems-level immunomonitoring from acute to recovery phase of severe COVID-19. *Cell Rep. Med.*, 2020, vol. 1, no. 5: 100078. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100078
81. Rydzynski Moderbacher C., Ramirez S.I., Dan J.M., Grifoni A., Hastie K.M., Weiskopf D., Belanger S., Abbott R.K., Kim C., Choi J., Kato Y., Crotty E.G., Kim C., Rawlings S.A., Mateus J., Tse L.P.V., Frazier A., Baric R., Peters B., Greenbaum J., Ollmann Saphire E., Smith D.M., Sette A., Crotty S. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. *Cell*, 2020, vol. 183, no. 4, pp. 996–1012.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.038
82. Santa Cruz A., Mendes-Frias A., Oliveira A.I., Dias L., Matos A.R., Carvalho A., Capela C., Pedrosa J., Castro A.G., Silvestre R. Interleukin-6 is a biomarker for the development of fatal severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 pneumonia. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 613422. doi: 10.3389/fimmu.2021.613422
83. Sattler A., Angermair S., Stockmann H., Heim K.M., Khadzhyrov D., Treskatsch S., Halleck F., Kreis M.E., Kotsch K. SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition. *J. Clin. Invest.*, 2020, vol. 130, no. 12, pp. 6477–6489. doi: 10.1172/JCI140965
84. Schultheiß C., Paschold L., Simnica D., Mohme M., Willscher E., von Wenserski L., Scholz R., Wieters I., Dahlke C., Tolosa E., Sedding D.G., Ciesek S., Addo M., Binder M. Next-generation sequencing of T and B cell receptor repertoires from COVID-19 patients showed signatures associated with severity of disease. *Immunity*, 2020, vol. 53, no. 2, pp. 442–455.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2020.06.024
85. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Stralin K., Gorin J.B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Enggård J., Parrot T., Folkesson E.; Karolinska COVID-19 Study Group,

- Rooyackers O., Eriksson L.I., Henter J.I., Sönnnerborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.G., Aleman S., Buggerd M. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell*, 2020, vol. 183, no. 1, pp. 158–168.e14. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.017
86. Shihabaw T. Inflammatory cytokine: IL-17A signaling pathway in patients present with COVID-19 and current treatment strategy. *J. Inflamm. Res.*, 2020, vol. 13, pp. 673–680. doi: 10.2147/JIR.S278335
 87. Silvin A., Chapuis N., Dunsmore G., Goubet A.G., Dubuisson A., Derosa L., Almire C., Hénon C., Kosmider O., Droin N., Rameau P., Catelain C., Alfaro A., Dussiau C., Friedrich C., Sourdeau E., Marin N., Szwebel T.A., Cantin D., Mouthon L., Borderie D., Deloger M., Bredel D., Mouraud S., Drubay D., Andrieu M., Lhonnear A.S., Saada V., Stoclin A., Willekens C., Pommeret F., Griscelli F., Ng L.G., Zhang Z., Bost P., Amit I., Barlesi F., Marabelle A., Pène F., Gachot B., André F., Zitvogel L., Ginhoux F., Fontenay M., Solary E. Elevated calprotectin and abnormal myeloid cell subsets discriminate severe from mild COVID-19. *Cell*, 2020, vol. 182, no. 6, pp. 1401–1418.e18. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.002
 88. Spoerl S., Kremer A.N., Aigner M., Eisenhauer N., Koch P., Meretuk L., Löffler P., Tenbusch M., Maier C., Überla K., Heinzerling L., Frey B., Lutzny-Geier G., Winkler T.H., Krönke G., Vetter M., Bruns H., Neurath M.F., Mackensen A., Kremer A.E., Völkl S. Upregulation of CCR4 in activated CD8⁺ T cells indicates enhanced lung homing in patients with severe acute SARS-CoV-2 infection. *Eur. J. Immunol.*, 2021, vol. 51, no. 6, pp. 1436–1448. doi: 10.1002/eji.202049135
 89. Tan A.T., Linster M., Tan C.W., Le Bert N., Chia W.N., Kunasegaran K., Zhuang Y., Tham C.Y.L., Chia A., Smith G.J.D., Young B., Kalimuddin S., Low J.G.H., Lye D., Wang L.F., Bertoletti A. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep.*, 2021, vol. 34, no. 6: 108728. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108728
 90. Tong X., Cheng A., Yuan X., Zhong X., Wang H., Zhou W., Xu X., Li Y. Characteristics of peripheral white blood cells in COVID-19 patients revealed by a retrospective cohort study. *BMC Infect. Dis.*, 2021, vol. 21, no. 1: 1236. doi: 10.1186/s12879-021-06899-7
 91. Van Eeden C., Khan L., Osman M.S., Cohen Tervaert J.W. Natural killer cell dysfunction and its role in COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 17: 6351. doi: 10.3390/ijms21176351
 92. Varchetta S., Mele D., Oliviero B., Mantovani S., Ludovisi S., Cerino A., Bruno R., Castelli A., Mosconi M., Vecchia M., Roda S., Sachs M., Klersy C., Mondelli M.U. Unique immunological profile in patients with COVID-19. *Cell Mol. Immunol.*, 2020, vol. 18, no. 3, pp. 604–612. doi: 10.1038/s41423-020-00557-9
 93. Vinuesa C.G., Linterman M.A., Yu D., MacLennan I.C. Follicular helper T cells. *Annu Rev. Immunol.*, 2016, vol. 34, pp. 335–368. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055605
 94. Vitte J., Diallo A.B., Boumaza A., Lopez A., Michel M., Allardet-Servent J., Mezouar S., Sereme Y., Busnel J.M., Miloud T., Malergue F., Morange P.E., Halfon P., Olive D., Leone M., Mege J.L. A granulocytic signature identifies COVID-19 and its severity. *J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 222, no. 12, pp. 1985–1996. doi: 10.1093/infdis/jiaa591
 95. Wang F., Nie J., Wang H., Zhao Q., Xiong Y., Deng L., Song S., Ma Z., Mo P., Zhang Y. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 221, no. 11, pp. 1762–1769. doi: 10.1093/infdis/jiaa150
 96. Weiskopf D., Schmitz K.S., Raadsen M.P., Grifoni A., Okba N.M.A., Endeman H., van den Akker J.P.C., Molenkamp R., Koopmans M.P.G., van Gorp E.C.M., Haagmans B.L., de Swart R.L., Sette A., de Vries R.D. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci. Immunol.*, 2020, vol. 5, no. 48: eabd2071. doi: 10.1126/sciimmunol.abd2071
 97. Wilk A.J., Rustagi A., Zhao N.Q., Roque J., Martínez-Colón G.J., McKechnie J.L., Ivison G.T., Ranganath T., Vergara R., Hollis T., Simpson L.J., Grant P., Subramanian A., Rogers A.J., Blish C.A. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat. Med.*, 2020, vol. 26, no. 7, pp. 1070–1076. doi: 10.1038/s41591-020-0944-y
 98. Winheim E., Rinke L., Lutz K., Reischer A., Leutbecher A., Wolfram L., Rausch L., Kranich J., Wratil P.R., Huber J.E., Baumjohann D., Rothenfusser S., Schubert B., Hilgendorff A., Hellmuth J.C., Scherer C., Muenchhoff M., von Bergwelt-Baildon M., Stark K., Straub T., Brocker T., Keppler O.T., Subklewe M., Krug A.B. Impaired function and delayed regeneration of dendritic cells in COVID-19. *PLoS Pathog.*, 2021, vol. 17, no. 10: e1009742. doi: 10.1371/journal.ppat.1009742
 99. Woodruff M.C., Ramonell R.P., Nguyen D.C., Cashman K.S., Saini A.S., Haddad N.S., Ley A.M., Kyu S., Howell J.C., Ozturk T., Lee S., Suryadevara N., Case J.B., Bugrovsky R., Chen W., Estrada J., Morrison-Porter A., Derrico A., Anam F.A., Sharma M., Wu H.M., Le S.N., Jenks S.A., Tipton C.M., Staitieh B., Daiss J.L., Ghosn E., Diamond M.S., Carnahan R.H., Crowe J.E. Jr., Hu W.T., Lee F.E., Sanz I. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat. Immunol.*, 2020, vol. 21, no. 12, pp. 1506–1516. doi: 10.1038/s41590-020-00814-z
 100. Xie G., Ding F., Han L., Yin D., Lu H., Zhang M. The role of peripheral blood eosinophil counts in COVID-19 patients. *Allergy*, 2021, vol. 76, no. 2, pp. 471–482. doi: 10.1111/all.14465
 101. Yan B., Yang J., Xie Y., Tang X. Relationship between blood eosinophil levels and COVID-19 mortality. *World Allergy Organ J.*, 2021, vol. 14, no. 3: 100521. doi: 10.1016/j.waojou.2021.100521
 102. Yao C., Bora S.A., Parimon T., Zaman T., Friedman O.A., Palatinus J.A., Surapaneni N.S., Matusov Y.P., Chiang G.C., Kassar A.G., Patel N., Green C.E.R., Aziz A.W., Suri H., Suda J., Lopez A.A., Martins G.A., Stripp B.R., Gharib S.A., Goodridge H.S., Chen P. Cell-type-specific immune dysregulation in severely ill COVID-19 patients. *Cell Rep.*, 2021, vol. 34, no. 13: 108943. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108943
 103. Youdi H., Bing Z., Shan Z., Xiaoqian W., Renxi W. Chemokine-expressing Th1 and treg cells are increased in the lung of patients with COVID-19. *SSRN Electronic Journal*, 2020. doi: 10.2139/ssrn.3629437
 104. Zhao Q., Yuan Y., Zhang J., Li J., Li W., Guo K., Wang Y., Chen J., Yan W., Wang B., Jing N., Ma B., Zhang Q. Early predictors of severe COVID-19 among hospitalized patients. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2021, pp. e24177. doi: 10.1002/jcla.24177
 105. Zhao Y., Kilian C., Turner J.E., Bosurgi L., Roedel K., Bartsch P., Gnirck A.C., Cortesi F., Schultheiß C., Hellmig M., Enk L.U.B., Hausmann F., Borchers A., Wong M.N., Paust H.J., Siracusa F., Scheibel N., Herrmann M., Rosati E., Bacher P., Kyllies D., Jarczack D., Lütgehetmann M., Pfefferle S., Steurer S., Zur-Wiesch J.S., Puelles V.G., Spherhake J.P., Addo M.M., Lohse A.W.,

- Binder M., Huber S., Huber T.B., Kluge S., Bonn S., Panzer U., Gagliani N., Krebs C.F. Clonal expansion and activation of tissue-resident memory-like Th17 cells expressing GM-CSF in the lungs of severe COVID-19 patients. *Sci. Immunol.*, 2021, vol. 6, no. 56: eabf6692. doi: 10.1126/sciimmunol.abf6692
106. Zheng M., Gao Y., Wang G., Song G., Liu S., Sun D., Xu Y., Tian Z. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol. Immunol.*, 2020, vol. 17, no. 5, pp. 533–535. doi: 10.1038/s41423-020-0402-2
107. Zhou R., To K.K., Wong Y.C., Liu L., Zhou B., Li X., Huang H., Mo Y., Luk T.Y., Lau T.T., Yeung P., Chan W.M., Wu A.K., Lung K.C., Tsang O.T., Leung W.S., Hung I.F., Yuen K.Y., Chen Z. Acute SARS-CoV-2 infection impairs dendritic cell and T cell responses. *Immunity*, 2020, vol. 53, no. 4, pp. 864–877.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2020.07.026
108. Zhu X., Zhu J. CD4 T helper cell subsets and related human immunological disorders. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 21: 8011. doi: 10.3390/ijms21218011

Авторы:

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;

Головкин А.С., д.м.н., руководитель группы генно-клеточной инженерии Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия;

Тотолян Арег А., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

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;

Golovkin A.S., PhD, MD (Medicine), Head of a Research Group of Genetic Cell Engineering, Institute of Molecular Biology and Genetics, V.A. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation;

Totolian Areg A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 15.02.2022
Принята к печати 25.02.2022

Received 15.02.2022
Accepted 25.02.2022

ЛИХОРАДКА ЛАССА. ЧАСТЬ 1. ЭТИОЛОГИЯ, ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА

Е.И. Казачинская^{1,2}, В.С. Арипов², А.В. Иванова², А.М. Шестопалов¹

¹ ФГБНУ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Новосибирск, Россия

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Резюме. Лихорадка Ласса (ЛЛ) — природно-очаговое заболевание, опасное для человека. На большей части Западной Африки к югу от Сахары 37,7 млн человек в 14 странах проживают в районах, где условия жизни способствуют для зоонозной передачи инфекции. Способами передачи могут быть алиментарный, воздушно-пылевой или воздушно-капельный пути при случайном контакте человека с выделениями инфицированных грызунов вида *Mastomys natalensis*, проникающих в жилища и места хранения продуктов и питьевой воды. Кроме того, местные жители употребляют этих животных в пищу, поэтому заражение возможно также при разделывании тушек. Этиологический агент этой болезни — вирус Ласса, один из представителей семейства *Arenaviridae*. В отличие от других аренавирусных инфекций (например, аргентинской и боливийской лихорадки, вызываемых вирусами Хунин и Мачупо соответственно), заражение людей вирусом Ласса может происходить также и от человека к человеку. Описаны случаи внутрибольничных вспышек ЛЛ среди пациентов в условиях плохой гигиены и через контаминированное медицинское оборудование. Медицинские работники инфицируются во время проведения хирургических операций или при контакте с пациентами, так как патоген может передаваться через кровь, слюну, рвоту, стул или мочу. На эндемичных территориях ЛЛ ассоциируется со значительной заболеваемостью, так как ежегодно регистрируется 500 тыс. клинических случаев и от 5 до 10 тыс. летальных исходов этой болезни (то есть 1–2%-ная летальность). Вероятность того, что эта болезнь станет более распространенной угрозой в мире, может быть связана с усилением глобализации, а также изменением климата, приводящим к расширению зоны эндемичности ЛЛ на регионы, пригодные для расселения *M. natalensis* и других видов грызунов, способных пожизненно переносить патоген. Среди госпитализированных лиц с тяжелыми геморрагическими симптомами летальность может быть очень высокой — от 14 до 89,5%. Но в большинстве случаев болезнь протекает бессимптомно, и в связи с ее длительным инкубационным периодом заболевшие могут быть источником инфекции, особенно при перемещении на большие расстояния авиа- и железнодорожным транспортом. Клинически выраженное заболевание протекает в виде разных неспецифических симптомов — от недомогания, повышения температуры тела, болей в горле и груди, кашля, миалгии и желудочно-кишечных расстройств до признаков нарушения ЦНС. Постановка диагноза ЛЛ зачастую вызывает затруднения из-за сходства протекания болезни с другими распространенными в Африке вирусными заболеваниями или, например, с малярией или брюшным тифом. Более специфические симптомы при ЛЛ выражаются в виде конъюнктивита, гепатита, фарингита, тонзиллита, а также появлением язв в ротоглотке. Тяжелое заболевание осложняется аномальным кровотечением, генерализованным отеком, дыхательной недостаточностью, гипотонией, протеинурией, повышением уровня печеночных трансаминаз, энцефалопатией. Глу-

Адрес для переписки:

Казачинская Елена Ивановна
630559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово,
ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 909 530-74-41.
E-mail: lena.kazachinskaia@mail.ru

Contacts:

Elena I. Kazachinskaia
630559, Russian Federation, Novosibirsk region, Koltsovo,
State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector".
Phone: +7 909 530-74-41.
E-mail: lena.kazachinskaia@mail.ru

Для цитирования:

Казачинская Е.И., Арипов В.С., Иванова А.В., Шестопалов А.М.
Лихорадка Ласса. Часть 1. Этиология, эпидемиология, клиническая
картина // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 427–438.
doi: 10.15789/2220-7619-EEA-1814

Citation:

Kazachinskaia E.I., Aripov V.S., Ivanova A.V., Shestopalov A.M. Lassa fever.
Part 1. Etiology, epidemiology and clinical manifestations // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3,
pp. 427–438. doi: 10.15789/2220-7619-EEA-1814

хота развивается примерно в 20% случаев от общего числа заболевших. Полиорганная недостаточность и открытое кровотечение приводит к смерти. Обзор посвящен анализу литературы по этиологии, эпидемиологии и клинической картине ЛЛ, так как существует опасность ее завоза с заболевшими людьми на территорию РФ.

Ключевые слова: лихорадка Ласса, вирус Ласса, особо опасные инфекции, этиология, эпидемиология, клиническая картина лихорадки Ласса.

LASSA FEVER. PART 1. ETIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND CLINICAL MANIFESTATIONS

Kazachinskaja E.I.^{a,b}, Aripov V.S.^b, Ivanova A.V.^b, Shestopalov A.M.^a

^a Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine of Ministry of Science and Higher Education Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

^b State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare (Rosпотребнадзор), Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. Lassa fever is a natural focal disease dangerous for humans. In the larger part of sub-Saharan West Africa 37.7 million people in 14 countries live in areas where living conditions are suitable for zoonotic transmission of the virus from secretions of infected rodents of the species *Mastomys natalensis*. Routes of transmission can be via alimentary, airborne dust or airborne droplet pathways in case of accidental human contact with secretions of infected rodents. *Mastomys natalensis* penetrates into residence and place of storage of food and drinking water. In addition, the residents use such animals for food, so infection is also possible upon butchering carcasses. The etiological agent of this disease is the Lassa virus being one of the members of the *Arenaviridae* family. Unlike other arenavirus infections (e.g., Argentine and Bolivian fevers caused by Junin viruses and Machupo, respectively), human infection with Lassa virus can also occur from person to person. Cases of nosocomial infection among patients in conditions of poor hygiene and through contaminated medical equipment are described. Medical workers become infected during surgical operations or through contact with patients, because the pathogen can be transmitted via blood, saliva, vomiting, stool or urine. In endemic territories, Lassa fever is associated with significant morbidity, because 500 thousand clinical cases and due to 5 to 10 thousand fatal outcomes of this disease are registered annually (i.e. 1–2% mortality). The likelihood that this disease will become a more widespread threat worldwide may be associated with increased globalization as well as climate change leading to the expansion of the Lassa fever endemic zone into regions suitable for the settlement of *M. natalensis* and other rodent species capable of lifelong pathogen carriage. Among hospitalized persons with severe hemorrhagic symptoms, the mortality rate can be very high — ranging from 14 to 89.5%. But in the majority of cases, the disease proceeds asymptotically, and due to its long-term incubation period all ill subjects may be a source of infection, especially travelling at long distance by plane or train. Clinically evident disease occurs in the form of various nonspecific symptoms — from malaise, fever, sore throat and chest, cough, myalgia and gastrointestinal disorders to signs of central nervous system disorders. The diagnosis of Lassa fever is often difficult due to the similarity of its course with other viral diseases common in Africa or malaria or typhoid fever. More specific symptoms for Lassa fever are revealed as conjunctivitis, hepatitis, pharyngitis, tonsillitis as well as developing oropharyngeal ulcers. Severe disease is complicated by abnormal bleeding, generalized edema, respiratory failure, hypotension, proteinuria, transaminitis, encephalopathy. Deafness develops in about 20% of cases. Multiple organ failure and open bleeding lead to death. The review is devoted to analyzing publications on the etiology, epidemiology and clinical picture of Lassa fever due to a threat of its importation with sick subjects to the territory of the Russian Federation.

Key words: Lassa fever, Lassa virus, particularly dangerous infection, etiology, epidemiology, clinical manifestation of Lassa fever.

Введение

По международной классификации болезней 11-го пересмотра (МКБ-11) лихорадке Ласса (ЛЛ, Lassa fever) присвоен код 1D61.2 [3]. В отличие от других аренавирусных инфекций (например, аргентинской и боливийской лихорадок, вызываемых вирусами Хунин и Мачупо, соответственно), заражение людей вирусом Ласса может происходить не только при случайном контакте с выделениями инфицированных грызунов вида *Mastomys natalensis* алиментарным, воздушно-пылевым, воздушно-капельным путем [5, 29, 64], а также и от человека к че-

ловеку через инфицированную кровь и другие выделения организма (слюну, рвоту, стул или мочу) [72]. На эндемичных территориях ЛЛ ассоциируется со значительной заболеваемостью населения [11, 54] и высокой летальностью среди госпитализированных лиц с тяжелыми геморрагическими симптомами [5, 16, 45, 54, 72, 77]. Эта болезнь эндемична для стран Африки, но с 2018 г. в «Плане исследований и разработок ВОЗ» обозначена как эпидемическая угроза для всего мира. Стратегия этого плана способствует исследованиям в области разработки диагностических тестов, вакцин и средств лечения [48]. ЛЛ внесена в перечень инфекционных

болезней, требующих мероприятий по санитарной охране территории РФ в связи с ее длительным инкубационным периодом, позволяющим бессимптомному заболевшему человеку быть источником инфекции и перемещаться на большие расстояния авиа- и железнодорожным транспортом [2].

Этиология

Этиологический агент ЛЛ — вирус Ласса (Lassa virus, LASV), циркулирующий в Западной Африке, отнесен к роду *Lassa mammarenavirus* семейства *Arenaviridae*, входящего в порядок *Bunyavirales* [4], как и другие аренавирусы [64] с неустановленной ассоциацией патогенности для человека (вирус Мопея, Морея и др.) и опасные. Например, вирус лимфоцитарного хориоменингита (Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV), Хунин (Junin virus, JUNV) и Мачупо (Machupo virus, MACV) также имеют зоонозный резервуар. В разных странах повсеместно для LCMV это обычная домашняя мышь *Mus musculus* и *Musdomesticus*, а также хомяки (Syrian hamster) [24], в Южной Америке для JUNV и MACV — виды мышей *Calomys masculinus* и *Callomys callosus* [78] соответственно.

Впервые LASV был выделен в 1969 г. в Нигерии из образцов тканей медицинских работников, погибших от острой геморрагической лихорадки во время вспышки неизвестной болезни в больнице города Ласса [18]. С тех пор в разных географических регионах Африки выделено несколько генотипов LASV. Вирусные изоляты до 2016 г. были генотипически разделены на шесть линий (I–VI). Из них I–III линии локализуются в Нигерии, IV циркулируют в Сьерре-Леоне, Гвинее, Либерии и Кот-д’Ивуаре [10, 18], V — в Мали и Кот-д’Ивуаре [44] и линия VI, в которую включили изолят Како, выделенный в Нигерии в 2016 г. от вида грызунов *Hylomyscus pumfi* [59]. В 2020 г. описана седьмая генетическая линия LASV, циркулирующая в Того [34].

Эпидемиология

Лихорадка Ласса — опасное для человека заболевание, является эндемичной в нескольких странах Западной Африки, в первую очередь в государствах региона реки Мано — Сьерра-Леоне, Гвинее и Либерии. Однако Нигерия несет наибольшее бремя этой болезни с точки зрения числа зарегистрированных случаев [11], а в Либерии отмечен более высокий уровень летальности среди заболевших [54]. Спорадические случаи заболевания людей были зарегистрированы в Того, Республике Бенин, Кот-д’Ивуаре и Мали [11]. Доказанные

случаи заболевания были также выявлены в Центральноафриканской Республике, Сенегале, Буркина-Фасо, Мозамбике и Демократической республике Конго, где обитает африканская многососковая крыса (*Mastomys natalensis*) — основной переносчик LASV [8, 38, 50, 64, 77]. Эти грызуны, у которых обычно от 8 до 12 пар сосков, производят большое количество потомства и обитают на открытых лугах, полянах смешанных саваннах и лесах. Для *M. natalensis* характерно бессимптомное носительство и пожизненная персистенция вируса, который сохраняет свои свойства при высыхании выделений (кала, мочи и слюны) инфицированных грызунов. Заражение людей, проживающих на эндемичных территориях, происходит при случайном непосредственном контакте с этими выделениями алиментарным, воздушно-пылевым, воздушно-капельным путем, когда грызуны поселяются в сельских человеческих жилищах и проникают в места хранения продуктов питания и питьевой воды. Кроме того, местные жители употребляют этих животных в пищу, поэтому заражение возможно также при разделывании тушек [5, 29, 64]. Признаки сезонности вспышек ЛЛ были задокументированы еще на ранних стадиях описания этого заболевания [51]. Более широкое распознавание случаев инфицирования людей LASV с применением диагностических тестов началось с 2000-х гг. и обеспечило дальнейшее понимание сезонной связи с зоонозными вспышками. Так, данные из Гвинеи свидетельствуют о том, что в сухой сезон, когда запасы продовольствия ограничены, *M. natalensis*, как правило, скапливаются в жилых домах. Однако количество LASV-положительных грызунов по ПЦР было в 2–3 раза выше в сезон дождей, чем в сухой сезон. Хотя передача инфекции от грызунов к людям происходит в течение всего года, повышенный риск воздействия загрязненных экскрементов грызунов в сухой сезон потенциально приводит к более высокому уровню случаев ЛЛ у людей [14, 27]. Аналогичный эффект был обнаружен в течение семи лет при наблюдении в период 2001–2018 гг. в Нигерии, где число случаев ЛЛ и госпитализаций оказалось неизменно выше в сухой сезон (январь–март) [9]. В конце 2019 г. органы здравоохранения Нигерии проинформировали, что последнее время болезнь возникает и распространяется в течение всего года [55]. Кроме того, местные жители употребляют *M. natalensis* в пищу, и поэтому заражение может произойти при разделывании тушек в любое время года [1]. Интересно, что в Сьерра-Леоне в период исследований 2008–2012 гг. были зарегистрированы пики случаев ЛЛ как в сухой (январь–март), так и в дождливый (июнь–август) сезоны [71].

Имеются данные о расширении зоны эндемичности ЛЛ на регионы, которые имеют схожую тропическую лесистую саванну, пригодную для расселения *M. natalensis* [64]. Моделирование вероятного зоонозного потенциала LASV было проведено при сопоставлении карт географического обитания этого вида грызунов и мест подтвержденных инфекций у человека (при выделении вируса из биологических проб и/или по данным серологических исследований). На основании полученных результатов сделан вывод о том, что 37,7 млн человек в 14 странах на большей части Западной Африки к югу от Сахары проживают в районах, где условия жизни подходят для зоонозной передачи LASV [53]. С изменением климата и усилением глобализации возрастает вероятность того, что ЛЛ станет более распространенной инфекцией в мире [6]. Недавно было установлено, что LASV циркулирует и среди других видов грызунов. Новые изоляты вируса выделены в Нигерии и Гвинее от видов грызунов *Hylomyscus pamfi* и *Mastomys erythroleucus*, которые, также как *M. natalensis*, переносят длительную и бессимптомную инфекцию [59]. Эти виды животных обитают в одних ареалах и вполне возможно, что происходит горизонтальная передача вируса между ними [77]. Среди *M. natalensis* горизонтальная передача вируса, вероятно, является преобладающим путем заражения. Но возможна и вертикальная передача, поскольку LASV может быть лабораторно выделен от животных разных возрастов [26, 27].

Исследования ЛЛ начались в 1969 г., когда она стала причиной тяжелой болезни одной медсестры-миссионерки и смерти двух ее коллег, ухаживающих за пациентами в больнице г. Ласса в Нигерии [18]. С 1970 г. клинический диагноз стали подтверждать иммунохимическими анализами с использованием антигена LASV и метода фиксации комплемента антителами сывороток крови реконвалесцентов [74]. Описано, что при сравнении соотношения общего количества лихорадочных болезней и случаев со смертельным исходом в двух больницах Сьерра-Леоне в 1987 г. было обнаружено, что ЛЛ была причиной 10–16% всех лихорадочных состояний, приводящих к госпитализации местного населения. Уровень летальности при этом составил от 16,5 до 30% [45]. Ежегодная заболеваемость ЛЛ в Африке колеблется от 100 тыс. до 300 тыс. случаев, и эти данные приводятся в литературе на основе оценок 1980-х гг. [47]. В более современных источниках сообщается цифра 500 тыс. ежегодных случаев ЛЛ [62] и регистрируется от пяти до 10 тыс. фатальных исходов этой болезни [64]. Общий показатель летальности от ЛЛ составляет 1–2% [69], но высокий уровень серопревалентности LASV-

специфических антител в общей человеческой популяции, проживающей на эндемичных территориях, указывает на то, что большинство случаев этой инфекции являются легкими или бессимптомными и не приводят к госпитализации [64]. Кроме того, клиническая диагностика ЛЛ часто осложняется из-за сходства протекания болезни с другими распространенными в регионе заболеваниями, например с малярией или брюшным тифом [8]. В среднем, у четырех из пяти инфицированных ЛЛ протекает без выраженных симптомов. Примерно 15–20% случаев инфекции приводят к заболеваниям различной степени тяжести [69]. Отмечено, что среди пациентов, госпитализированных с тяжелыми симптомами геморрагической лихорадки, показатель летальности составляет 20% и увеличивается до 50% среди младенцев и беременных женщин. Тяжелое протекание ЛЛ у беременных приводит к 100%-й внутриутробной гибели эмбрионов и плодов [28, 45, 63].

На эндемичных территориях в Нигерии зафиксирован количественный рост случаев ЛЛ и уровень летальности от числа заболевших — от 14% в 2008–2009 гг. [5] до 36% в 2017 г. Эти цифры могут быть заниженными, так как среди местного населения распространено табу на посмертные обследования родственников для подтверждения диагноза [8]. Высокая летальность (69%) среди пациентов с диагнозом ЛЛ была зафиксирована в период с 2008–2012 гг. в Сьерра-Леоне [16], в государственной больнице г. Кенема, открытой в 1976 г. при поддержке Центра по контролю и профилактике заболеваний (Centre for Disease Control, CDC) США [39]. Вспышка болезни, вызываемой вирусом Эбола (БВВЭ), в Сьерра-Леоне в 2014–2016 гг. способствовала более тщательному эпидемиологическому мониторингу и случаев ЛЛ в этой больнице. На основании результатов, полученных с использованием современных методов исследования по выявлению вирусного генетического материала или серологических маркеров, показатели летальности среди пациентов от ЛЛ до и после вспышки БВВЭ составили 65,5% (148 из 226 с подтвержденным диагнозом) и 89,5% (17 из 19), соответственно. Также было отмечено, что при меньшем количестве заболевших наблюдалось более тяжелое течение аренавирусной болезни [72]. При продолжающейся с 2016 г. вспышке ЛЛ в Нигерии, по данным на апрель в 2019 г., зарегистрирована 22%-ная летальность среди пациентов (124 из 554 с подтвержденным диагнозом) [55] и заразились 18 медицинских работников [22]. На сайте ВОЗ нет данных о том, продолжается ли вспышка ЛЛ в 2021 г. — видимо из-за пандемии COVID-19 такие исследования пока недоступны. По официальной статистике этой организации за период с 1

по 9 февраля 2020 г. на территории 26 из 36 штатов Нигерии, а также федерального столичного округа, было зарегистрировано 472 лабораторно подтвержденных случая заболевания ЛЛ, включая 70, закончившихся фатально (летальность — 14,8%). На основе результатов анализа геномных последовательностей патогена, выделенного из образцов, собранных в 2019 г. от пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом, показано, что заболевшие люди, попавшие одновременно в один госпиталь, как правило инфицированы разными генотипами вируса, то есть заражение госпитализированных лиц произошло независимо от зоонозных резервуаров [31]. Причем рост заболеваемости отмечен в начале засушливого сезона (в ноябре), что, как предполагают, связано с высокой репродукцией грызунов и увеличением миграции инфицированных животных [79]. Olayem A. с соавт. в 2018 г. сообщили о расширении территориального местообитания в южные штаты Нигерии вида *M. erythroleucus* [60] недавно открытого этими же авторами в 2016 г. нового «хозяина» для LASV [59], обычно обитающего в северной и центральной частях этой страны.

Ранее считалось, что распространение LASV от человека к человеку не имеет эпидемиологического значения [40], но по данным Lo Iacopo с соавт. [42], этот путь составляет 19% от количества зарегистрированных случаев ЛЛ. С момента идентификации LASV такая передача была документирована при нескольких внутрибольничных вспышках [19, 49], что привело к требованию и соблюдению строгих карантинных мер [21]. Но вскоре после этого было признано зоонозное происхождение болезни, так как в качестве резервуара вируса идентифицирован вид грызунов *M. natalensis* [50] и показано, что при использовании барьерного метода защиты, включающего обязательное использование перчаток, халатов и масок, риск внутрибольничной передачи вируса от человека человеку может быть незначительным [30, 33]. Тем не менее вторичные инфекции часто возникают в больницах среди пациентов в условиях плохой гигиены [28, 49] или через контаминированное медицинское оборудование, например, при инъекции лекарственных препаратов повторно используемыми иглами. Смертельные случаи заражения среди медицинских работников происходят при нарушении правил контактных мер предосторожности. Например, описано, что в 1995 г. в двух госпиталях Нигерии, где было 34 инфицированных, погибли 20 пациентов, а также шесть медсестер, терапевт и два хирурга, заразившиеся во время экстренной операции [28]. В Нигерии в 2018 и 2019 гг. из общего числа заболевших (633 и 554), было зарегистрировано, соответственно, 45 и 18 случаев заражения ме-

дицинского персонала [22]. В 2018 г. в Нигерии среди медицинских работников был зафиксирован 8%-ный уровень летальных исходов в результате их инфицирования во время контактов с пациентами [22]. В связи с этим рекомендации CDC заключаются в использовании барьерных средств ухода, включая перчатки, халаты, маски и защитные очки, а также изолирование пациентов с подозрением на ЛЛ в отдельные боксовые помещения [67]. ВОЗ рекомендует медицинскому персоналу находиться в пределах 1 м от заболевшего и также использовать перчатки, халаты с длинными рукавами, маски и защитные очки [68].

Инфицированные лица становятся заразными уже в начале появления легких симптомов ЛЛ, и контагиозность повышается с усилением тяжести болезни [13]. LASV циркулирует в крови заболевших на фоне высокого уровня антител, поэтому инфицированные люди являются эпидемиологической опасностью для медицинского персонала и окружающих лиц [5]. Передача патогена происходит через прямой контакт с инфицированной кровью или выделениями организма, такими как слюна, рвотные массы, стул или моча [28]. Есть данные, что вирус выделяется из организма инфицированных в течение одного месяца и более [43], в крови обнаруживается до 70-ти суток от начала заболевания [32, 69], в сперме — до 103-х суток, что создает риск передачи патогена половым путем [65]. Описаны также внутриутробное заражение и врожденная ЛЛ [52].

Данные по летальности от ЛЛ в разных источниках сильно варьируют, отмечается связь географического возникновения вспышек с клиническими симптомами болезни, вероятно из-за различной вирулентности вирусных генотипов. Однако роль конкретного генотипа LASV в тяжести заболевания неизвестна [1]. Имеются данные о вирусной реассортации при мультигенотипной инфекции в пределах одного хозяина [17]. Филогенетический анализ изолятов, выделенных от пациентов во время вспышки в 2014 г. в двух больницах на юго-востоке Нигерии, показал идентичность генотипов, что подтверждает данные передачи вируса без участия зоонозного резервуара [61]. Есть мнение, что резкое увеличение случаев ЛЛ в Нигерии в 2018 г. связано с появлением нового генотипа с более высокой скоростью передачи от человека к человеку [37]. Секвенирование геномов LASV, изолированных от пациентов в Нигерии в 2018 г., показало их высокую вариабельность и диверсификацию от ранее циркулирующих генотипов вируса, но не от одного доминирующего, то есть заражение людей, скорее всего, произошло через независимые события межвидовой передачи вируса [37, 73]. В настоящее время не уста-

новлена точная причина увеличения выявляемых случаев ЛЛ. Возможно, что это связано с улучшением диагностики, а также с миграцией грызунов, инфицированных разными вирусными генотипами [73].

В отличие от большинства других агентов самого высокого класса уровня биозащиты (Biosafety level) — BSL-4, а по стандартам РФ — 1 группы патогенности), например филловирусов Эбола и Марбург, которые вызывают географически ограниченные временные эпидемии, LASV, как полагают, циркулирует на большей части Западной Африки, поэтому ЛЛ там широко распространена [69]. Импортированная ЛЛ (33 случая) была зарегистрирована в течение 1969–2016 гг. в США, Канаде, Великобритании, Нидерландах, Германии, Израиле и Японии. Возрастной диапазон этих пациентов составил от 18 до 72 лет. Одиннадцать человек были медицинскими работниками, остальные — путешественниками или специалистами разных профессий (инженеры, бизнесмены, геологи, учителя, гуманитарные работники). Двадцать человек самостоятельно отправились к постоянному месту жительства на коммерческих авиалайнерах, несмотря на то что большинство из них имели некоторые симптомы недомогания. Остальных заболевших эвакуировали на родину уже в тяжелом состоянии. В результате летальность среди этих инфицированных лиц составила 39% [41]. Два случая вторичной передачи LASV с дальнейшим выздоровлением от ЛЛ описаны в Германии. Первый произошел в 2003 г. с врачом, который без использования каких-либо средств индивидуальной защиты провел медицинский осмотр и взял образцы крови у пациента, прибывшего из эндемичного района. Врач не заболел, возможно, из-за экстренного применения рибавирина в профилактических целях, однако позднее в сыворотке его крови были обнаружены вирус-специфические антитела [32]. Второй случай вторичной передачи LASV произошел с патологоанатомом при вскрытии тела погибшего медицинского работника, который в тяжелом состоянии был эвакуирован из Того [56]. В конце ноября 2019 г. в госпитале г. Масанга в Сьерра-Леоне два врача из Нидерландов заразились при оперировании беременной женщины, один из них в дальнейшем скончался [15]. По последним данным (на 2021 г.), количество импортированных случаев ЛЛ из Африки составляет 35 эпизодов [11].

Из результатов недавнего исследования по эпидемиологическому моделированию следует, что за пределами Западной Африки странами, подверженными наибольшему риску ввоза заболевших с ЛЛ, являются США, Великобритания, ОАЭ и ЮАР [75]. При завозных случаях этой болезни природные оча-

ги LASV на новых территориях, вероятно, не смогут сформироваться, так как этот патоген имеет ограниченное число видов животных-хозяев. Тем не менее изучаются подходящие восприимчивые биологические модели — разные линии мышей и морских свинок, некоторые виды нечеловекообразных приматов [64]. Есть предположение, что кошки и собаки могут быть резервуаром для вируса [11]. Но экспериментальных исследований в этом направлении пока нет. Рассматривается и путь передачи вируса в природе от человека к животным [42]. Например, Olayemi A. с соавт. в 2020 г. показали, что последовательности изолятов LASV от людей, проживающих в двух высокоэндемичных местностях (Екрота в Нигерии и Кенета в Сьерра-Леоне), оказались филогенетически более древними по сравнению с последовательностями, обнаруженными у грызунов, отловленных на территории соответствующих городов, что указывает на возможность обратного зооноза [58].

Клиническая картина

Для подтверждения диагноза ЛЛ необходимо лабораторное тестирование, так как на африканском континенте, распространены как многочисленные вирусные инфекции (грипп, лихорадка денге, желтая лихорадка и др.), так и малярия или брюшной тиф [8, 65], этиологические агенты которых отнесены в различные семейства, но имеют сходные клинические проявления вызываемых болезней [12]. Раннее выявление и дифференциальный диагноз ЛЛ имеют решающее значение для применения доступной противовирусной терапии, поскольку показано, что эффективность лечения рибавирином быстро снижается после клинического начала заболевания [23, 66].

После проникновения LASV в организм через слизистые оболочки дыхательного и пищеварительного трактов или поврежденные кожные покровы инкубационный период обычно длится примерно 5–16 суток, но может быть в диапазоне 3–21 суток. Болезнь обычно начинается с лихорадки и множества других неспецифических проявлений, включающих недомогание, боль в груди и в горле, головную боль, кашель, миалгию и желудочно-кишечные симптомы (тошноту, рвоту и диарею) [45, 67, 68]. Температура тела может подниматься до 40°C, увеличиваются периферические лимфатические узлы. В начальный период инфекции у большинства заболевших (до 80%) развивается язвенный фарингит, при этом на слизистой оболочке глотки, мягкого неба и миндалин появляются белые пятна, позднее превращающиеся в язвы с желтым дном и красным обод-

ком [5, 76]. Анализ импортированных случаев ЛЛ в период 1969–2016 гг. показал, что почти 50% заболевших имели отличительные клинические признаки — лихорадку, фарингит, боль в горле, тонзиллит, конъюнктивит, язвы в ротоглотке и протенурию (белок в моче) [41]. В большинстве случаев ЛЛ симптомы слабо выражены, однако тяжелое заболевание, осложненное аномальным кровотечением, генерализованным отеком, дыхательной недостаточностью, гипотонией (пониженным давлением), протеинурией, повышенным уровнем печеночных ферментов, энцефалопатией или глухотой, развивается примерно в 20% случаев от числа заболевших [45, 67, 68]. Гепатит средней и тяжелой степени часто наблюдается у больных с ЛЛ, но не является основной причиной смерти [46]. Открытое кровотечение возникает примерно в 30% тяжелых случаев и является признаком неблагоприятного исхода ЛЛ. Как правило, смерть пациентов наступает от полиорганной недостаточности между 10–14-ми сутками после появления симптомов болезни [71]. Во время вспышек высокие показатели летальности были зарегистрированы среди беременных женщин, особенно в третьем триместре беременности [63]. В период с января 1980 г. по март 1984 г. в двух больницах в Либерии было выявлено 33 случая детской ЛЛ. Восемнадцать эмбрионов (на сроках до трех месяцев беременности) и плодов погибли. Летальность для 15-ти случаев в детском возрасте (до 12 лет) составила 27%. Авторы дали определение «синдром опухшего ребенка» из-за наблюдаемых обширных отеков и вздутия живота у заболевших детей. Болезнь при такой отличительной клинической картине, сочетанной с кровотечением, обычно заканчивается смертью в трех из четырех случаев. Отсутствие этого синдрома, по-видимому, является хорошим прогностическим показателем у детей [52].

На последних стадиях тяжелой болезни при ЛЛ наблюдаются признаки нарушения ЦНС — судороги, тремор, дезориентация и кома [5, 69]. Прогностически неблагоприятно также появление отеков лица и шеи, плевральных и перитонеальных экссудатов, воспаление серозного перикарда (экссудативный перикардит). Отеки развиваются вследствие повышенной проницаемости стенок капилляров, что приводит к инфекционно-токсическому шоку и острой почечной недостаточности [5]. Исследования, проведенные во время текущей с 2016 г. вспышки в Нигерии, показали, что степень повреждения почек при ЛЛ является важной клинической особенностью и определяющим фактором выживания. Дисфункция почек — плохой прогностический признак. Но раннее распознавание этого осложнения и вовремя начатое лечение

может значительно снизить количество летальных исходов среди заболевших [7, 57].

Еще в 1987 г. при исследовании сывороток крови 137 пациентов с ЛЛ при их поступлении в госпиталь было установлено, что вероятность летального исхода значительно возрастала с титром вирусии более 10^3 ТЦД₅₀/мл (тканевых цитопатических доз в миллилитре) и с уровнем фермента аспаратаминотрансферазы равным или выше показателя 150 МЕ/л. Инфекционный вирус был выделен из более чем 100 образцов сывороток крови, в которых на фоне выявленной вирусии также содержались антитела классов IgM и IgG в высоких титрах [36]. Уровень вирусии достигает пика через 4–9 суток после начала болезни на фоне нарушения иммунитета [20] — как Т-клеточного [70], так и гуморального [35] — при инфицировании профессиональных антиген-презентирующих клеток — дендритных клеток и макрофагов.

При легком и среднетяжелом течении ЛЛ прогноз обычно благоприятный, при этом лихорадочный период может длиться до трех недель, температура тела снижается постепенно [5]. Элиминация вируса из крови выздоравливающих происходит примерно в течение трех недель [69]. После выздоровления у пациентов может быть временное выпадение волос и нарушение походки. В большинстве случаев реконвалесценция протекает медленно. Возможны рецидивы заболевания и такие осложнения как пневмония, миокардит, психоз. Слух частично восстанавливается через 1–3 месяца только у половины из пострадавших [5]. Потеря слуха, которая случается как при тяжелом, так и легком течении ЛЛ [64], может стать причиной хронической инвалидности и приводить к различным пагубным последствиям, включая задержку речи у детей, снижение экономической производительности у взрослых и ускоренное ослабление когнитивных способностей у пожилых. По данным Ficenec S. с соавт. [25], при кагортном обследовании людей по степени потери слуха после перенесенных тропических болезней — лихорадки Зика, БВВЭ и ЛЛ — соотношение выглядит как 21,2, 5,7 и 8,5% соответственно.

Заключение

Как показал анализ литературы, в Африке происходит расширение зоны эндемичности ЛЛ и выявлены новые виды грызунов — *Hylomyscus pamfi* и *M. erythroleucus*, которые также как и основной переносчик LASV — африканская многососковая крыса (*M. natalensis*) — имеют пожизненную бессимптомную инфекцию. Все эти виды животных обитают в одних ареалах и, возможно, между ними происходит горизон-

тальная передача вируса. Миграция инфицированных грызунов способствует повышению риска заражения людей. Инфекция в человеческой популяции распространяется в течение всего года через продукты питания и питьевую воду, загрязненные выделениями инфицированных животных, попадающих в жилища, или при разделывании тушек при употреблении их в пищу.

LASV циркулирует в крови заболевших людей на фоне высокого уровня антител, поэтому инфицированные являются эпидемиологической опасностью для медицинского персонала и окружающих. Заболевшие лица становятся заразными уже в начале появления легких симптомов ЛЛ и контагиозность повышается с усилением тяжести болезни. Есть данные, что вирус выделяется из организма инфицированных в течение одного месяца и более, в крови обнаруживается до 70-ти суток от начала заболевания, а в сперме — до 103-х, что создает риск передачи патогена половым путем. Зарегистрированы также внутриутробное заражение и врожденная ЛЛ. Для предотвращения распространения болезни от человека к человеку CDC и ВОЗ рекомендуют использовать барьерные средства ухода, включая перчатки, халаты, маски и защитные очки, а также изолировать пациентов с подозрением на ЛЛ в отдельные боксовые помещения. Описаны завозные случаи ЛЛ и вторичная передача вируса от человека человеку, но природные очаги LASV на новых территориях, вероятно, не смогут сформироваться, так как этот патоген имеет ограниченное число видов животных-хозяев. Тем не менее некоторые виды лабораторных животных — мыши, морские свинки и приматы — оказались восприимчивы к заражению. Роль кошек и собак в качестве резервуара вируса обсуждается, но экспериментальных исследований пока что нет.

Высокий уровень серопревалентности LASV-специфических антител в общей человеческой популяции, проживающей на эндемичных территориях, является подтверждением эпидемиологических данных, что большинство случаев

инфекции протекают легко или бессимптомно. Но примерно 15–20% случаев клинически выраженной ЛЛ протекают с различной степенью тяжести. В регионах Западной Африки регистрируется от 5 до 10 тыс. летальных исходов от этой болезни в год. Данные по летальности от этой болезни в разных источниках сильно варьируют — от общего показателя в 1–2% до почти 90% в отдельно взятых больницах среди госпитализированных пациентов. Отмечается связь географического возникновения вспышек с клиническими симптомами болезни, вероятно, из-за различной вирулентности генотипов. Однако роль конкретного генотипа LASV в тяжести заболевания неизвестна.

LASV проникает в организм через слизистые оболочки дыхательного и пищеварительного трактов или поврежденные кожные покровы, инкубационный период длится примерно 5–16 суток, но может быть в диапазоне 3–21 суток. При легком и среднетяжелом течении ЛЛ прогноз обычно благоприятный, хотя возможно такое осложнение как потеря слуха. В тяжелых случаях нарушение иммунитета приводит к вирусемии, уровень которой достигает пика через 4–9 суток после начала болезни. Открытое кровотечение возникает примерно в 30% тяжелых случаев ЛЛ и является признаком неблагоприятного исхода болезни, как и полиорганная недостаточность. Дисфункция почек также плохой прогностический признак, но раннее распознавание этого осложнения и вовремя начатое лечение может значительно снизить количество летальных исходов среди заболевших. Реконвалесценция протекает медленно. Возможны рецидивы тяжелого заболевания и такие осложнения как пневмония, миокардит, психоз. Слух частично восстанавливается через 1–3 месяца только у половины из пострадавших.

Конфликт интересов

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы/References

1. Андаев Е.И., Мельникова О.В., Титенко А.М. Санитарная охрана территории от завоза и распространения особо опасных вирусных инфекций. Сообщение 5. Лихорадка Ласса // Проблемы особо опасных инфекций. 2008. № 1 (95). С. 17–22. [Andaev E.I., Mel'nikova O.V., Titenko A.M. Sanitary protection of the territories from delivery and distribution of especially dangerous viral infections. Message 5. Lassa Fever. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2008, no. 1 (95), pp. 17–22. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2008-1(95)-17-22
2. Вишняков В.А. Клинический критерий при формировании диагноза лихорадки Ласса в случае завоза на территорию Российской Федерации // Acta Biomedica Scientifica. 2011. № 3 (79), часть 1. С. 236–239. [Vishnyakov V.A. Clinical criterion at lassa fever diagnosis at probable importation to Russian Federation. *Acta Biomedica Scientifica*, 2011, no. 3 (79), pt. 1, pp. 236–239. (In Russ.)]
3. Международная классификация болезней 11-го пересмотра (МКБ-11). [International Classification of Diseases, 11th Revision (ICD-11)] URL: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http://id.who.int/icd/entity/515020316>

4. Международный комитет по таксономии вирусов. [International Committee on Taxonomy of Viruses] URL: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=19790162&src=NCBI&ictv_id=19790162
5. Шатохина И.А., Тимофеев М.А. Геморрагическая лихорадка Ласса // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. 2015. № 1 (10). С. 39–44. [Shatokhina I.V., Timofeev M.A. Lassa fever. *Infezioni e malattie infettive: News, Opinions, Training*, 2015, no. 1 (10), pp. 39–44. (In Russ.)]
6. Abreu-Mota T., Hagen K.R., Cooper K., Jahrling P.B., Tan G., Wirblich C., Johnson R.F., Schnell M.J. Non-neutralizing antibodies elicited by recombinant Lassa-Rabies vaccine are critical for protection against Lassa fever. *Nat Commun.*, 2018, vol. 9, no. 1: 4223. doi: 10.1038/s41467-018-06741-w
7. Adetunji A.E., Ayenale M., Akhigbe I., Akerele L.O., Isibor E., Idialu J., Aideloje F.O., Emuebonam E., Aire C., Adomeh D.I., Odia I., Atafo R.O., Okonofua M.O., Owobu A., Ogbaini-Emovon E., Tobin E.A., Asogun D.A., Okogbenin S.A., Sabeti P., Happi C.T., Günther S., Azubuike C.O., Rafiu M., Odike A., Olomu S.C., Ibadin M.O., Okokhere P.O., Akpede G.O. Acute kidney injury and mortality in pediatric Lassa fever versus question of access to dialysis. *Int. J. Infect. Dis.*, 2021, vol. 103, pp. 124–131. doi: 10.1016/j.ijid.2020.11.006
8. Akhmetzhanov A.R., Asai Y., Nishiura H. Quantifying the seasonal drivers of transmission for Lassa fever in Nigeria. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.*, 2019, vol. 374, no. 1775: 20180268. doi: 10.1098/rstb.2018.0268
9. Akpede G.O., Asogun D.A., Okogbenin S.A., Dawodu S.O., Momoh M.O., Dongo A.E., Ike C., Tobin E., Akpede N., Ogbaini-Emovon E., Adewale A.E., Ochei O., Onyike F., Okonofua M.O., Atafo R.O., Odia I., Adomeh D.I., Odigie G., Ogbeifun C., Muebonam E., Ihekweazu C., Ramharter M., Colubri A., Sabeti P.C., Happi C.T., Günther S., Agbonlahor D.E. Caseload and case fatality of Lassa fever in Nigeria, 2001–2018: a specialist center’s experience and its implications. *Front. Public Health*, 2019, vol. 7: 170. doi: 10.3389/fpubh.2019.00170
10. Andersen K.G., Shapiro B.J., Matranga C.B., Sealson R., Lin A.E., Moses L.M., Folarin O.A., Goba A., Odia I., Ehiane P.E., Momoh M., England E.M., Winnicki S., Branco L.M., Gire S.K., Phelan E., Tariyal R., Tewhey R., Omoniwa O., Fullah M., Fonnier R., Fonnier M., Kanneh L., Jalloh S., Gbakie M., Saffa S., Karbo K., Gladden A.D., Qu J., Stremmler M., Nekoui M., Finucane H.K., Tabrizi S., Vitti J.J., Birren B., Fitzgerald M., McCowan C., Ireland A., Berlin A.M., Bochicchio J., Tazon-Vega B., Lennon N.J., Ryan E.M., Bjornson Z., Milner D.A. Jr., Lukens A.K., Broodie N., Rowland M., Heinrich M., Akdag M., Schieffelin J.S., Levy D., Akpan H., Bausch D.G., Rubins K., McCormick J.B., Lander E.S., Günther S., Hensley L., Okogbenin S.; Viral Hemorrhagic Fever Consortium, Schaffner S.F., Okokhere P.O., Khan S.H., Grant D.S., Akpede G.O., Asogun D.A., Gnirke A., Levin J.Z., Happi C.T., Garry R.F., Sabeti P.C. Clinical sequencing uncovers origins and evolution of Lassa virus. *Cell*, 2015, vol. 162, no. 4, pp. 738–750. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.020
11. Arruda L.B., Haider N., Olayemi A., Simons D., Ehichioya D., Yinka-Ogunleye A., Ansumana R., Thomason M.J., Asogun D., Ihekweazu C., Fichet-Calvet E., Kock R.A. The niche of One Health approaches in Lassa fever surveillance and control. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2021, vol. 20, no. 1: 29. doi: 10.1186/s12941-021-00431-0
12. Baumann J., Knüpfer M., Ouedraogo J., Traoré B.Y., Heitzer A., Kané B., Maïga B., Sylla M., Kouriba B., Wölfel R. Lassa and Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses, Mali. *Emerg. Infect. Dis.*, 2019, vol. 25, no. 5, pp. 999–1002. doi: 10.3201/eid2505.18104
13. Bausch D.G., Hadi C.M., Khan S.H., Lertora J.J.L. Review of the literature and proposed guidelines for the use of oral ribavirin as postexposure prophylaxis for Lassa fever. *Clin. Infect. Dis.*, 2010, vol. 51, no. 12, pp. 1435–1441. doi: 10.1086/657315
14. Bausch D.G., Demby A.H., Coulibaly M., Kanu J., Goba A., Bah A., Conde N., Wurtzel H.L., Cavallaro K.F., Lloyd E., Baldet F.B., Cissé S.D., Fofona D., Savané I.K., Tolno R.T., Mahy B., Wagoner K.D., Ksiazek T.G., Peters C.J., Rollin P.E. Lassa fever in Guinea: I. epidemiology of human disease and clinical observations. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2001, vol. 1, no. 4, pp. 269–281. doi: 10.1089/15303660160025903
15. BBC NEWS. Lassa fever “at risk” Britons sent home from Sierra Leone. November 25, 2019. URL: <https://www.bbc.com/news/health-50543489>
16. Boisen M.L., Hartnett J.N., Shaffer J.G., Goba A., Momoh M., Sandi J.D., Fullah M., Nelson D.K.S., Bush D.J., Rowland M.M., Heinrich M.L., Koval A.P., Cross R.W., Barnes K.G., Lachenauer A.E., Lin A.E., Nekoui M., Kotliar D., Winnicki S.M., Siddie K.J., Gbakie M., Fonnier M., Koroma V.J., Kanneh L., Kulakosky P.C., Hastie K.M., Wilson R.B., Andersen K.G., Folarin O.O., Happi C.T., Sabeti P.C., Geisbert T.W., Saphire E.O., Khan S.H., Grant D.S., Schieffelin J.S., Branco L.M., Garry R.F. Field validation of recombinant antigen immunoassays for diagnosis of Lassa fever. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8: 5939. doi: 10.1038/s41598-018-24246-w
17. Bowen M.D., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Hustad H.L., Bausch D.G., Demby A.H., Bajani M.D., Peters C.J., Nichol S.T. Genetic diversity among Lassa virus strains. *J. Virol.*, 2000, vol. 74, no. 15, pp. 6992–7004. doi: 10.1128/jvi.74.15.6992-7004.2000
18. Buckley S.M., Casals J. Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. 3. Isolation and characterization of the virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1970, vol. 19, no. 4, pp. 680–691. doi: 10.4269/ajtmh.1970.19.680
19. Carey D.E., Kemp G.E., White H.A., Pinneo L., Addy R.F., Fom A.L., Strohm G., Casals J., Henderson B.E. Lassa fever. Epidemiological aspects of the 1970 epidemic, Jos, Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1972, vol. 66, no. 3, pp. 402–408. doi: 10.1016/0035-9203(72)90271-4
20. Chen J.P., Cosgriff T.M. Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 2000, no. 11, pp. 461–483. doi: 10.1097/00001721-200007000-00010
21. Cooper C.B., Gransden W.R., Webster M., King M., O’Mahony M., Young S., Banatvala J.E. A case of Lassa fever: experience at St. Thomas’s Hospital. *BMJ*, 1982, vol. 285, pp. 1003–1005. doi: 10.1136/bmj.285.6347.1001
22. Dan-Nwafor C.C., Furuse Y., Ilori E.A., Ipadeola O., Akabike K.O., Ahumibe A., Ukponu W., Bakare L., Okwor T.J., Joseph G., Mba N.G., Akano A., Olayinka A.T., Okoli I., Okea R.A., Makava F., Ugbogulu N., Oladele S., Namara G., Muwanguzi E.N., Naidoo D., Mutbam S.K., Okudo I., Woldetsadik S.F., Lasuba C.L., Ihekweazu C. Measures to control protracted large Lassa fever outbreak in Nigeria, 1 January to 28 April 2019. *Euro Surveill.*, 2019, vol. 24, no. 20: 1900272. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.20.1900272

23. Duvignaud A., Jaspard M., Etafo I.C., Gabillard D., Serra B., Abejegah C., le Gal C., Abidoye A.T., Doutchi M., Owihin S., Séri B., Vihundira J.K., Béreer-Camara M., Schaeffer J., Danet N., Augier A., Ogbaini-Emovon E., Salam A.P., Ahmed L.A., Duraffour S., Horby P., Günther S., Adedosu A.N., Ayodeji O.O., Anglaret X., Malvy D; LASCOPE Study Group. Lassa fever outcomes and prognostic factors in Nigeria (LASCOPE): a prospective cohort study. *Lancet Glob. Health.*, 2021, vol. 9, no. 4, pp. e469–e478. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30518-0
24. Emonet S., Retornaz K., Gonzalez J.-P., Lamballerie X., Charrel R.N. Mouse-to-human transmission of variant Lymphocytic choriomeningitis virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, vol. 13, pp. 472–475. doi: 10.3201/eid1303.061141
25. Ficenec S.C., Schieffelin J.S., Emmett S.D. A review of hearing loss associated with Zika, Ebola, and Lassa fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2019, vol. 101, no. 3, pp. 484–490. doi: 10.4269/ajtmh.18-0934
26. Fichet-Calvet E., Lecompte E., Koivogui L., Daffis S., ter Meulen J. Reproductive characteristics of *Mastomys natalensis* and Lassa virus prevalence in Guinea, West Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2008, vol. 8, no. 1, pp. 41–48. doi: 10.1089/vbz.2007.0118
27. Fichet-Calvet E., Lecompte E., Koivogui L., Soropogui B., Dore A., Kourouma F., Sylla O., Daffis S., Koulemou K., Ter Meulen J. Fluctuation of abundance and Lassa virus prevalence in *Mastomys natalensis* in Guinea West Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2007, vol. 7, no. 2, pp. 119–128. doi: 10.1089/vbz.2006.0520
28. Fisher-Hoch S.P., Tomori O., Nasidi A., Perez-Oronoz G.I., Fakile Y., Hutwagner L., McCormick J.B. Review of cases of nosocomial Lassa fever in Nigeria: the high price of poor medical practice. *BMJ*, 1995, vol. 311, no. 7009, pp. 857–859. doi: 10.1136/bmj.311.7009.857
29. Goba A., Khan S.H., Fonnio M., Fullah M., Moigboi A., Kovoma A., Sinnah V., Yoko N., Rogers H., Safai S., Momoh M., Koroma V., Kamara F.K., Konowu E., Yillah M., French I., Mustapha I., Kanneh F., Foday M., McCarthy H., Kallon T., Kallon M., Naiebu J., Sellu J., Jalloh A.A., Gbokie M., Kanneh L., Massaly J.L., Kargbo D., Kargbo B., Vandi M., Gbetuwa M., Gevao S.M., Sandi J.D., Jalloh S.C., Grant D.S., Blyden S.O., Crozier I., Schieffelin J.S., McLellan S.L., Jacob S.T., Boisen M.L., Hartnett J.N., Cross R.W., Branco L.M., Andersen K.G., Yozwiak N.L., Gire S.K., Tariyal R., Park D.J., Haislip A.M., Bishop C.M., Melnik L.I., Gallaher W.R., Wimley W.C., He J., Shaffer J.G., Sullivan B.M., Grillo S., Oman S., Garry C.E., Edwards D.R., McCormick S.J., Elliott D.H., Rouelle J.A., Kannadka C.B., Reyna A.A., Bradley B.T., Yu H., Yenni R.E., Hastie K.M., Geisbert J.B., Kulakosky P.C., Wilson R.B., Oldstone M.B., Pitts K.R., Henderson L.A., Robinson J.E., Geisbert T.W., Saphire E.O., Happi C.T., Asogun D.A., Sabeti P.C., Garry R.F.; Viral Hemorrhagic Fever Consortium and Viral Hemorrhagic Fever Consortium. An outbreak of Ebola virus disease in the Lassa fever zone. *Infect. Dis.*, 2016, vol. 214, no. 3, pp. 110–121. doi: 10.1093/infdis/jiw239
30. Grahn A., Bråve A., Tolfvenstam T., Studahl M. Absence of nosocomial transmission of imported Lassa fever during use of standard barrier nursing methods. *Emerg. Infect. Dis.*, 2018, vol. 24, no. 6, pp. 972–977. doi: 10.3201/eid2406.17209
31. Günther S. Lassa virus sequencing in Nigeria — Final field report (75 samples). *Edinburgh: Virological*, 2019. URL: <http://virological.org/t/2019-lassa-virus-sequencing-in-nigeria-final-field-report-75-samples/291>
32. Haas W.H., Breuer T., Pfaff G., Schmitz H., Köhler P., Asper M., Emmerich P., Drosten C., Gölnitz U., Fleischer K., Günther S. Imported Lassa fever in Germany: surveillance and management of contact persons. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, vol. 36, no. 10, pp. 1254–1258. doi: 10.1086/374853
33. Helmick C.G., Webb P.A., Scribner C.L., Krebs J.W., McCormick J.B. No evidence for increased risk of Lassa fever infection in hospital staff. *Lancet*, 1986, vol. 2, no. 8517, pp. 1202–1205. doi: 10.1016/s0140-6736(86)92206-3
34. Ibukun F.I. Inter-lineage variation of Lassa virus glycoprotein epitopes: a challenge to Lassa virus vaccine development. *Viruses*, 2020, vol. 12, no. 4: 386. doi: 10.3390/v12040386
35. Jiang X., Huang Q., Wang W., Dong H., Ly H., Liang Y., Dong C. Structures of arenaviral nucleoproteins with triphosphate dsRNA reveal a unique mechanism of immune suppression. *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288, no. 23, pp. 16949–16959. doi: 10.1074/jbc.M112.420521
36. Johnson K.M., McCormick J.B., Webb P.A., Smith E.S., Elliott L.H., King I.J. Clinical virology of Lassa fever in hospitalized patients. *J. Infect. Dis.*, 1987, vol. 155, no. 3, pp. 456–464. doi: 10.1093/infdis/155.3.456
37. Kafetzopoulou L.E., Pullan S.T., Lemey P., Suchard M.A., Ehichioya D.U., Pahlmann M., Thielebein A., Hinzmann J., Oestereich L., Wozniak D.M., Eftymiadis K., Schachten D., Koenig F., Matjeschek J., Lorenzen S., Lumley S., Ighodalo Y., Adomeh D.I., Olorok T., Omomoh E., Omiunu R., Agbukor J., Ebo B., Aiyepada J., Ebhodaghe P., Osiemi B., Ehikhametalor S., Akhilomen P., Airende M., Esumeh R., Muoebonam E., Giwa R., Ekanem A., Igenegbale G., Odigie G., Okonofua G., Enigbe R., Oyakhilome J., Yerumoh E.O., Odia I., Aire C., Okonofua M., Atafo R., Tobin E., Asogun D., Akpede N., Okokhere P.O., Rafiu M.O., Iraoyah K.O., Iruolagbe C.O., Akhideno P., Eramah C., Akpede G., Isibor E., Naidoo D., Hewson R., Hiscox J.A., Vipond R., Carroll M.W., Ihekweazu C., Formenty P., Okogbenin S., Ogbaini-Emovon E., Günther S., Duraffour S. Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak. *Science*, 2019, vol. 363, no. 6422, pp. 74–77. doi: 10.1126/science.aau934
38. Kelly J.D., Barrie M.B., Ross R.A., Temple B.A., Moses L.M., Bausch Daniel G. Housing equity for health equity: a rights-based approach to the control of Lassa fever in post-war Sierra Leone. *BMC Int. Health Hum. Rights*, 2013, vol. 13: 2. doi: 10.1186/1472-698X-13-2
39. Khan S.H., Goba A., Chu M., Roth C., Healing T., Marx A., Fair J., Guttieri M.C., Ferro P., Imes T., Monagin C., Garry R.F., Bausch D.G. New opportunities for field research on the pathogenesis and treatment of Lassa fever. *Antiviral Res.*, 2008, vol. 78, no. 1, pp. 103–115. doi: 10.1016/j.antiviral.2007.11.003
40. Knobloch J., McCormick J.B., Webb P.A., Dietrich M., Schumacher H.H., Dennis E. Clinical observations in 42 patients with Lassa fever. *Tropenmed. Parasitol.*, 1980, vol. 31, no. 4, pp. 389–398.
41. Kofman A., Choi M.J., Rollin P.E. Lassa Fever in Travelers from West Africa, 1969–2016. *Emerg. Infect. Dis.*, 2019, vol. 25, no. 2, pp. 245–248. doi: 10.3201/eid2502.18083
42. Lo Iacono G., Cunningham A.A., Fichet-Calvet E., Garry R.F., Grant D.S., Khan S.H., Leach M., Moses L.M., Schieffelin J.S., Shaffer J.G., Webb C.T., Wood J.L. Using modelling to disentangle the relative contributions of zoonotic and anthroponotic transmission: the case of lassa fever. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2015, vol. 9, no. 1: e3398. doi: 10.1371/journal.pntd.0003398

43. Lukashevich I.S., Patterson J., Carrion R., Moshkoff D., Ticer A., Zapata J., Brasky K., Geiger R., Hubbard G.B., Bryant J., Salvato M.S. A live attenuated vaccine for Lassa fever made by reassortment of Lassa and Mopeia viruses. *J. Virol.*, 2005, vol. 79, no. 22, pp. 13934–13942. doi: 10.1128/JVI.79.22.13934-13942.2005
44. Manning J.T., Forrester N., Paessler S. Lassa virus isolates from Mali and the Ivory Coast represent an emerging fifth lineage. *Front. Microbiol.*, 2015, vol. 6: 1037. doi: 10.3389/fmicb.2015.01037
45. McCormick J.B., King I.J., Webb P.A., Johnson K.M., O'Sullivan R., Smith E.S., Trippel S., Tong T.C. A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever. *J. Infect. Dis.*, 1987, vol. 155, no. 3, pp. 445–455. doi: 10.1093/infdis/155.3.445
46. McCormick J.B., Walker D.H., King I.J., Webb P.A., Elliott L.H., Whitfield S.G., Johnson K.M. Lassa virus hepatitis: a study of fatal Lassa fever in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1986, vol. 352, no. 2, pp. 401–407. doi: 10.4269/ajtmh.1986.35.401
47. McCormick J.B., Webb P.A., Krebs J.W., Johnson K.M., Smith E.S. A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever. *J. Infect. Dis.*, 1987, vol. 155, no. 3, pp. 437–444. doi: 10.1093/infdis/155.437
48. Mehand M.S., Al-Shorbaji F., Millett P., Murgue B. The WHO R&D Blueprint: 2018 review of emerging infectious diseases requiring urgent research and development efforts. *Antiviral Res.*, 2018, vol. 159, pp. 63–67. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.09.009
49. Monath T.P., Mertens P.E., Patton R., Moser C.R., Baum J.J., Pinneo L., Gary G.W., Kissling R.E. A hospital epidemic of Lassa fever in Zorzor, Liberia, March–April 1972. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1973, vol. 22, no. 6, pp. 773–779. doi: 10.4269/ajtmh.1973.22.773
50. Monath T.P., Newhouse V.F., Kemp G.E., Setzer H.W., Cacciapuoti A. Lassa virus isolation from *Mastomys natalensis* rodents during an epidemic in Sierra Leone. *Science*, 1974, vol. 185, no. 4147, pp. 263–265. doi: 10.1126/science.185.4147.263
51. Monath T.P. Lassa fever: review of epidemiology and epizootiology. *Bull. World Health Organ.*, 1975, vol. 52, no. 4–6, pp. 577–592.
52. Monson M.H., Cole A.K., Frame J.D., Serwint J.R., Alexander S., Jahrling P.B. Pediatric Lassa fever: a review of 33 Liberian cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1987, vol. 36, no. 2, pp. 408–415. doi: 10.4269/ajtmh.1987.36.408
53. Mylne A.Q., Pigott D.M., Longbottom J., Shearer F., Duda K.A., Messina J.P., Weiss D.J., Moyes C.L., Golding N., Hay S.I. Mapping the zoonotic niche of Lassa fever in Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2015, vol. 109, no. 8, pp. 483–492. doi: 10.1093/trstmh/trv047
54. Naidoo D., Ihekweazu C. Nigeria's efforts to strengthen laboratory diagnostics — why access to reliable and affordable diagnostics is key to building resilient laboratory systems. *Afr. J. Lab. Med.*, 2020, vol. 9, no. 2: a1019. doi: 10.4102/ajlm.v9i2.1019
55. Nigeria Centre for Disease Control (NCDC). National Guidelines for Lassa fever case Management. Abuja: NCDC, 2018. 58 p.
56. Nikisins S., Rieger T., Patel P., Müller R., Günther S., Niedrig M. International external quality assessment study for molecular detection of Lassa virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2015, vol. 9, no. 5: e0003793. doi: 10.1371/journal.pnt.0003793
57. Okokhere P., Colubri A., Azubike C., Iruolagbe C., Osazuwa O., Tabrizi S., Chin E., Asad S., Ediale E., Rafiu M. Clinical and laboratory predictors of Lassa fever outcome in a dedicated treatment facility in Nigeria: a retrospective, observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.*, 2018, vol. 18, no. 6, pp. 684–695. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30121-X
58. Olayemi A., Adesina A.S., Strecker T., Magassouba N., Fichet-Calvet E. Determining ancestry between rodent- and human-derived virus sequences in endemic foci: towards a more integral molecular epidemiology of Lassa fever within West Africa. *Biology (Basel)*, 2020, vol. 9, no. 2: 26. doi: 10.3390/biology9020026
59. Olayemi A., Cadar D., Magassouba N., Obadare A., Kourouma F., Oyeyiola A., Fasogbon S., Igbokwe J., Rieger T., Bockholt S., Jérôme H., Schmidt-Chanasit J., Garigliany M., Lorenzen S., Igbahenah F., Fichet J.-N., Ortsega D., Omilabu S., Günther S., Fichet-Calvet E. New hosts of the Lassa virus. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6: 25280. doi: 10.1038/srep25280
60. Olayemi A., Oyeyiola A., Obadare A., Igbokwe J., Adesina A.S., Onwe F., Ukwaja K.N., Ajayi N.A., Rieger T., Günther S., Fichet-Calvet E. Widespread arenavirus occurrence and seroprevalence in small mammals, Nigeria. *Parasit. Vectors*, 2018, vol. 11, no. 1: 416. doi: 10.1186/s13071-018-2991-5
61. Oloniniyi O.K., Unigwe U.S., Okada S., Kimura M., Koyano S., Miyazaki Y., Iroezindu M.O., Ajayi N.A., Chukwubike C.M., Chika-Igwenyi N.M., Ndu A.C., Nwidi D.U., Abe H., Urata S., Kurosaki Y., Yasuda J. Genetic characterization of Lassa virus strains isolated from 2012 to 2016 in southeastern Nigeria. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2018, vol. 12, no. 11: e0006971. doi: 10.1371/journal.pnt.0006971
62. Prescott J.B., Marzi A., Safronetz D., Robertson S.J., Feldmann H., Best S.M. Immunobiology of Ebola and Lassa virus infections. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, vol. 17, no. 3, pp. 195–207. doi: 10.1038/nri.2016.138
63. Price M.E., Fisher-Hoch S.P., Craven R.B., McCormick J.B. A prospective study of maternal and fetal outcome in acute Lassa fever infection during pregnancy. *BMJ*, 1988, no. 297, pp. 584–587. doi: 10.1136/bmj.297.6648.584
64. Purushotham J., Lambe T., Gilbert S.C. Vaccine platforms for the prevention of Lassa fever. *Immunol. Lett.*, 2019, no. 215, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.imlet.2019.03.008
65. Raabe V., Koehler J. Laboratory Diagnosis of Lassa Fever. *J. Clin. Microbiol.*, 2017, vol. 55, no. 6, pp. 1629–1637. doi: 10.1128/JCM.00170-17
66. Raabe V.N., Kann G., Ribner B.S., Morales A., Varkey J.B., Mehta A.K., Lyon G.M., Vanairsdale S., Faber K., Becker S., Eickmann M., Strecker T., Brown S., Patel K., De Leuw P., Schuettfort G., Stephan C., Rabenau H., Klens J.D., Rollin P.E., McElroy A., Ströher U., Nichol S., Kraft C.S., Wolf T; Emory Serious Communicable Diseases Unit. Favipiravir and ribavirin treatment of epidemiologically linked cases of Lassa fever. *Clin. Infect. Dis.*, 2017, vol. 65, no. 5, pp. 855–859. doi: 10.1093/cid/cix40
67. Report Centers for Disease Control and Prevention. Lassa fever-prevention. URL: <https://www.cdc.gov/vhf/lassa/prevention/index.html>
68. Report World Health Organization: Lassa fever. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs179/en>
69. Richmond J.K., Baglolle D.J. Lassa fever: epidemiology, clinical features, and social consequences. *BMJ*, 2003, no. 327, pp. 1271–1275. doi: 10.1136/bmj.327.7426.1271
70. Schaeffer J., Carnec X., Reynard S., Mateo M., Picard C., Pietrosevoli N., Dillies M.A., Baize S. Lassa virus activates myeloid dendritic cells but suppresses their ability to stimulate T cells. *PLoS Pathog.*, 2018, vol. 14, no. 11: e1007430. doi: 10.1371/journal.ppa.1007430

71. Shaffer J.G., Grant D.S., Schieffelin J.S., Boisen M.L., Goba A., Hartnett J.N., Levy D.C., Yenni R.E., Moses L.M., Fullah M., Momoh M., Fonnin M., Fonnin R., Kanneh L., Koroma V.J., Kargbo K., Ottomassathien D., Muncy I.J., Jones A.B., Illick M.M., Kulakosky P.C., Haislip A.M., Bishop C.M., Elliot D.H., Brown B.L., Zhu H., Hastie K.M., Andersen K.G., Gire S.K., Tabrizi S., Tariyal R., Stremlau M., Matschiner A., Sampey D.B., Spence J.S., Cross R.W., Geisbert J.B., Folarin O.A., Happi C.T., Pitts K.R., Geske F.J., Geisbert T.W., Saphire E.O., Robinson J.E., Wilson R.B., Sabeti P.C., Henderson L.A., Khan S.H., Bausch D.G., Branco L.M., Garry R.F.; Viral Hemorrhagic Fever Consortium. Lassa fever in post-conflict Sierra Leone. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2014, vol. 8, no. 3: e2748. doi: 10.1371/journal.pnt.0002748
72. Shaffer J.G., Schieffelin J.S., Gbakie M., Alhasan F., Roberts N.B., Goba A., Randazzo J., Momoh M., Moon T.D., Kanneh L., Levy D.C., Podgorski R.M., Hartnett J.N., Boisen M.L., Branco L.M., Samuels R., Grant D.S., Garry R.F.; Viral Hemorrhagic Fever Consortium. Viral Hemorrhagic Fever Consortium. A medical records and data capture and management system for Lassa fever in Sierra Leone: approach, implementation, and challenges. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 3: e0214284. doi: 10.1371/journal.pone.0214284
73. Siddle K.J., Eromon P., Barnes K.G., Mehta S., Oguzie J.U., Odia I., Schaffner S.F., Winnicki S.M., Shah R.R., Qu J., Wohl S., Brehio P., Iruolagbe C., Aiyepada J., Uyigie E., Akhilomen P., Okonofua G., Ye S., Kayode T., Ajogbasile F., Uwanibe J., Gaye A., Momoh M., Chak B., Kotliar D., Carter A., Gladden-Young A., Freije C.A., Omoregie O., Osiemi B., Muoebonam E.B., Airende M., Enigbe R., Ebo B., Nosamiefan I., Oluniyi P., Nekoui M., Ogbaini-Emovon E., Garry R.F., Andersen K.G., Park D.J., Yozwiak N.L., Akpede G., Ihekweazu C., Tomori O., Okogbenin S., Folarin O.A., Okokhere P.O., MacInnis B.L., Sabeti P.C., Happi C.T. Genomic analysis of Lassa virus during an increase in cases in Nigeria in 2018. *N. Engl. J. Med.*, 2018, vol. 379, no. 18, pp. 1745–1753. doi: 10.1056/NEJMoa1804498
74. Troup J.M., White H.A., Fom A.L., Carey D.E. An outbreak of Lassa fever on the Jos plateau, Nigeria, in January–February 1970. A preliminary report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1970, vol. 19, no. 4, pp. 695–696. doi: 10.4269/ajtmh.1970.19.695
75. Tuite A.R., Watts A.G., Kraemer M.U.G., Khan K., Bogoch I.I. Potential for seasonal Lassa fever case exportation from Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2019, vol. 100, no. 3, pp. 647–651. doi: 10.4269/ajtmh.18-0753
76. White H.A. Lassa fever. A study of 23 hospital cases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1972, vol. 66, no. 3, pp. 390–401. doi: 10.1016/0035-9203(72)90269-6
77. Yaro C.A., Kogi E., Opara K.N., Batiha G.E.-S., Baty R.S., Albrakati A., Altalbawy F.M.A., Etuh I.U., Oni J.P. Infection pattern, case fatality rate and spread of Lassa virus in Nigeria. *BMC Infect. Dis.*, 2021, vol. 21, no. 1: 149. doi: 10.1186/s12879-021-05837-x
78. Zapato J.C., Salvato M.S. Arenavirus variations due to hosts-specific adaptation. *Viruses*, 2013, vol. 5, pp. 241–278. doi: 10.3390/v5010241
79. Zhao S., Musa S.S., Fu H., He D., Qin J. Large-scale Lassa fever outbreaks in Nigeria: quantifying the association between disease reproduction number and local rainfall. *Epidemiol. Infect.* 2020: 148:e4. doi: 10.1017/S0950268819002267

Авторы:

Казачинская Е.И., д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела экспериментального моделирования патогенеза инфекционных заболеваний ФГБУН Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Новосибирск, Россия; ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Арипов В.С., аспирант, младший научный сотрудник отдела биоинженерии ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Иванова А.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела биоинженерии ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Шестопалов А.М., д.б.н., профессор, зав. отделом экспериментального моделирования патогенеза инфекционных заболеваний ФГБУН Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Новосибирск, Россия.

Authors:

Kazachinskaja E.I., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Department of Experimental Modeling of Pathogenesis of Infectious Diseases, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine of the Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation; Leading Researcher, Department of Bioengineering, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Aripov V.S., PhD Candidate, Junior Researcher, Department of Bioengineering, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Ivanova A.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Bioengineering, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Shestopalov A.M., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Department of Experimental Modeling of Pathogenesis of Infectious Diseases, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine of the Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.11.2021
Отправлена на доработку 21.11.2021
Принята к печати 14.03.2022

Received 04.11.2021
Revision received 21.11.2021
Accepted 14.03.2022

АНТИГЕНЫ ESAT-6 И CFP-10 КАК СУБСТРАТ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ МОЛЕКУЛЫ. ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ

Д.А. Кудлай^{1,2}, Н.П. Докторова³

¹ ФГБУ Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, Россия

³ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. Рекомбинантные технологии уже давно и широко применяются в медицине. В статье представлен обзор применения медицинских технологий на основе белков ESAT-6 и CFP-10 в диагностике туберкулеза. ESAT-6 и CFP-10 — специфические белки, гены которых закодированы в зоне RD-1 (region of difference) *M. tuberculosis*. RD-1 фрагмент генома, отсутствующих у *M. bovis* BCG и у большинства нетуберкулезных микобактерий. Открытие антигенов ESAT-6 и CFP-10 позволило сделать первый и пока единственный прорыв в совершенствовании диагностики латентной туберкулезной инфекции со времен внедрения самой первой внутрикожной туберкулиновой пробы (ВТП). В статье описан принцип действия и опыт применения диагностических инструментов на основе ESAT-6 и CFP-10, таких как *in vitro* interferon-gamma release assays (IGRA-тесты) и *in vivo* аллерген туберкулезный рекомбинантный (АТР, Диаскинтест). АТР вводится внутрикожно, аналогично ВТП, и вызывает развитие аллергической реакции замедленного типа, что свидетельствует о присутствии *M. tuberculosis* в организме. Совместное применение ESAT-6 и CFP-10 для раннего выявления туберкулезной инфекции позволило компенсировать многие недостатки ВТП. В исследованиях доказана высокая чувствительность и специфичность тестов на основе ESAT-6 и CFP-10, благодаря чему на результаты тестирования перестало влиять наличие вакцинации БЦЖ в прошлом, снизилась частота ложноположительных результатов из-за реакции на нетуберкулезные микобактерии. Результаты крупного метаанализа исследований с участием пациентов из групп повышенного риска показали, что риск развития туберкулеза у лиц с положительным результатом IGRA-тестов превышает риск развития туберкулеза у лиц с отрицательным результатом в 9,35 раз (95% доверительный интервал (95% ДИ [6,48–13,49]), в то время как в случае ВТП — в 4,24 раза (95% ДИ [3,3–5,46]). Общая точность АТР по данным метаанализа на основе 61 публикации составляет 95,1% (95% ДИ [95,06–95,1]). Проведенный анализ литературы продемонстрировал наличие значительной доказательной базы в отношении эффективности тестов на основе ESAT-6 и CFP-10 при диагностике туберкулезной инфекции. В статье рассмотрены диагностические тесты и вакцины на основе упомянутых белков, находящиеся в настоящее время на этапе разработки.

Ключевые слова: ESAT-6, CFP-10, *Mycobacterium tuberculosis*, биотехнологическая платформа, interferon-gamma release assays, IGRA-тесты, T-SPOT.TB, аллерген туберкулезный рекомбинантный, C-Tb, рекомбинантный белок ESAT-6–CFP-10.

Адрес для переписки:

Кудлай Дмитрий Анатольевич
115522, Россия, Москва, Каширское ш., 24,
ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА.
Тел.: 8 985 761-02-37.
E-mail: D624254@gmail.com

Contacts:

Dmitry A. Kudlay
115522, Russian Federation, Moscow, Kashirskoye sh., 24,
National Research Center — Institute of Immunology.
Phone: +7 985 761-02-37.
E-mail: D624254@gmail.com

Для цитирования:

Кудлай Д.А., Докторова Н.П. Антигены ESAT-6 и CFP-10 как субстрат биотехнологической молекулы. возможности применения в медицине // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 439–449.
doi: 10.15789/2220-7619-EAC-1763

Citation:

Kudlay D.A., Doktorova N.P. ESAT-6 and CFP-10 antigens as a biotechnology molecule substrate. applications in medicine // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 439–449.
doi: 10.15789/2220-7619-EAC-1763

ESAT-6 AND CFP-10 ANTIGENS AS A BIOTECHNOLOGY MOLECULE SUBSTRATE. APPLICATIONS IN MEDICINE

Kudlay D.A.^{a,b}, Doktorova N.P.^c

^a National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

^b I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^c National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Abstract. Recombinant technologies have been long widely used in medicine. This article presents a review on the application of medical technologies based on ESAT-6 and CFP-10 proteins in diagnostics and prevention of tuberculosis. ESAT-6 and CFP-10 are specific proteins whose genes are encoded in the RD-1 zone (region of difference) of *M. tuberculosis*. *M. bovis* BCG and in most nontuberculous mycobacteria lack the RD-1 genome fragment. The discovery of ESAT-6 and CFP-10 antigens allowed to make the first and so far, the only breakthrough in improving the diagnostics of latent tuberculosis infection after the first tuberculin skin test (TST) was implemented. The article describes the principle of action and the experience with diagnostic tools based on ESAT-6 and CFP-10 such as *in vitro* interferon-gamma release assays (IGRA) and *in vivo* recombinant tuberculosis allergen (RTA, Diaskintest). RTA is inoculated intradermally similar to TST followed by developing delayed-type immune reaction detected in the area closest to *M. tuberculosis*. Combined use of ESAT-6 and CFP-10 for early detection of tuberculosis infection allowed to ameliorate for many drawbacks related to TST. High sensitivity and specificity was confirmed for ESAT-6- and CFP-10-based tests, so that former BCG vaccination had no more effect on test results and lowered frequency of false positive results due to reaction to non-tuberculous mycobacteria. The results of a large-scale meta-analysis on studies with patients at high risk demonstrated that the risk of developing tuberculosis in subjects with positive vs. negative IGRA was increased by 9.35-fold (95% confidence interval (CI) [6.48–13.49]), whereas for TST — by 4.24-fold (95% CI [3.3–5.46]). 95.1%, (95% CI [95.06–95.1]). Analyzing available publications demonstrated sufficient evidence base regarding efficacy of using ESAT-6–CFP-10-based tests in tuberculosis diagnostics. Finally, there are also reviewed the diagnostic tests and vaccines based on using such proteins currently being under development.

Key words: ESAT-6, CFP-10, *Mycobacterium tuberculosis*, biotechnology platform, interferon-gamma release assays, IGRAs, T-SPOT.TB, recombinant tuberculosis allergen, recombinant protein CFP-10:ESAT-6.

Введение

Рекомбинантные технологии уже давно и широко применяются в медицине. С их помощью создаются лекарственные, диагностические и профилактические средства. Рекомбинантные технологии являются отраслью генной инженерии и подразумевают модификацию генного материала (ДНК, РНК) с целью синтеза целевого белка. Синтезированные белки могут выступать в качестве лекарственных препаратов (инсулины, факторы свертывания крови, интерфероны, генотерапевтические препараты, ферментные средства талиглуцераза альфа, веллаглуцераза альфа и т. д.), средств профилактики (вакцины) и диагностики для использования в иммуногистохимии, иммуноферментном анализе, проточной цитофлуориметрии и др.

Важность и необходимость рекомбинантных технологий обусловлена не только огромным потенциалом создания новых белковых молекул, но и рядом ограничений, связанных с источниками получения белка и особенностями реакции живых организмов на чужеродные белки. В силу сложности своего строения белки могут синтезироваться только живыми организмами, а выделение их из живых организмов связано с рядом проблем, к числу которых относятся потенциальные различия в строении

одного и того же белка и загрязнение целевого экстракта балластными веществами. Вторая проблема — любые чужеродные белки живыми организмами воспринимаются как антигены и при повторной встрече организма с антигеном развивается иммунный ответ. Введение гетерогенного по строению белка, смеси белков или смеси белков с низкомолекулярными соединениями усиливает иммунную реакцию на их повторное введение. При создании лекарственных средств в большинстве случаев (кроме, возможно, пищеварительных ферментов) это является неприемлемым — фармацевтическая субстанция должна быть стандартизованной и минимально иммуногенной, а применение рекомбинантных технологий позволяет в значительной мере устранить перечисленные проблемы. Напротив, при создании вакцин используются полноценные бактерии или вирусы в виде ослабленных (аттенуированных) штаммов или их фрагменты именно с целью формирования надежного иммунитета за счет воздействия целого комплекса антигенов. Промежуточное положение между лекарственными средствами и вакцинами занимают диагностические средства. В зависимости от цели применения, их состав и чистота могут заметно различаться, поэтому в некоторых случаях, например, при диагностике наличия аллергии используются экстракты

из источника аллергена, содержащие большое количество антигенов и балластных веществ, в других случаях может требоваться более чистое и однообразное по строению средство, так как это влияет на такие важные параметры любого диагностического теста как чувствительность и специфичность.

Настоящая работа посвящена рассмотрению биотехнологической платформы на основе рекомбинантных белков ESAT-6 и CFP-10 являющихся антигенами ряда микобактерий, включая *M. tuberculosis*, нашедших широкое применение в диагностике латентной туберкулезной инфекции.

Предпосылки разработки биотехнологической платформы на основе белков ESAT-6 и CFP-10 для совершенствования диагностики латентной туберкулезной инфекции

ESAT-6 и CFP-10 — белки, синтезируемые рядом микобактерий из группы *M. tuberculosis complex* — *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai* и *M. marinum* [4, 29]. ESAT-6 (англ. early secreted antigenic target) — ранний секретируемый антиген с массой 6 kDa обладает литической активностью и способствует проникновению микобактерии в клетку, а также дестабилизирует фагосомы, позволяя микобактерии покинуть фагосому и переместиться в цитозоль макрофага, тем самым избежав лизиса [36, 43]. CFP-10 (англ. culture filtrate protein, син. Rv3874) — белок клеточного фильтрата с массой 10 kDa, образующий комплекс с ESAT-6 и обеспечивающий его доставку к месту действия [43]. Оба белка являются антигенами микобактерий и широко используются в диагностике латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ), а также являются компонентами противотуберкулезных вакцин, находящихся в данный момент на этапе клинических исследований [26, 23].

Арсенал средств для диагностики активного туберкулеза достаточно широк — микроскопические и микробиологические методы, молекулярно-генетическое тестирование, изучение клинических проявлений заболеваний, лучевые методы визуализации легких и лимфатических узлов и т. д. При этом для диагностики ЛТИ — формы заболевания, когда возбудитель туберкулеза только присутствует в организме человека, но инфекционный процесс еще не начался — упомянутые методы диагностики неприменимы [33]. Особое внимание к ЛТИ вызвано тем, что, согласно современной парадигме, лечение туберкулеза необходимо начинать на ранних стадиях, желательно на этапе

ЛТИ, не дожидаясь проявления клинических признаков заболевания. Такая практика обусловлена тем, что туберкулез является жизнеугрожающим заболеванием, лечение которого усложняется по мере его прогрессирования; распространены формы туберкулеза с устойчивостью к отдельным противотуберкулезным препаратам, что затрудняет и удлинняет лечение; а также тем, что страдающие от туберкулеза могут инфицировать окружающих [3]. Самым высоким риском развития туберкулеза обладают люди, страдающие ВИЧ, часто контактирующие с больными туберкулезом, заключенные и страдающие силикозом легких. Меньшим, но повышенным по сравнению с общей популяцией, риском развития туберкулеза обладают беженцы, недавно прибывшие иммигранты, люди, нуждающиеся в диализе, недавно перенесшие пересадку органов, а также получающие иммуносупрессирующую терапию [21].

До 1996 г. единственным широко применяемым и хорошо изученным способом массового скрининга на туберкулез была туберкулиновая проба (проба Манту, внутрикожная туберкулиновая проба [ВТП]) — внутрикожное введение туберкулина (здесь и далее под туберкулином имеется в виду туберкулин PPD, от англ. purified protein derivative) с последующей регистрацией ответа на введение. Возникновение ответа, проявляющегося формированием инфильтрата (папулы) в месте введения, должно свидетельствовать о наличии сенсibilизации организма возбудителем туберкулеза и о его присутствии в организме, что является основанием для начала превентивной противотуберкулезной терапии, однако в действительности причин ответа несколько больше, что затрудняет интерпретацию результатов. Первое, на что следует указать, это то, что туберкулин является не чистым соединением, а смесью — фильтратом убитых нагреванием *M. tuberculosis* (в случае туберкулина PPDRT23 и PPD-S) или *M. tuberculosis* и *M. bovis* (в случае туберкулина PPD-L). Следствием упомянутого факта является достаточно высокая чувствительность теста, но низкая специфичность. Возникновение ответа на его введение может означать как сенсibilизацию, указывающую на присутствие в организме микобактерий, способных вызвать туберкулез, так и на присутствие в организме нетуберкулезных микобактерий, которые не способны вызвать туберкулез, или наличие в анамнезе вакцинации БЦЖ (вакцина, содержащая аттенуированный штамм *M. bovis* субштамма BCG-1, обладающий ослабленной вирулентностью и практически полной неспособностью вызвать туберкулез у человека). Последний фактор особенно сильно влияет на интерпретацию результатов ввиду того, что вакцина БЦЖ является

очень распространенной в ряде стран и в том числе в РФ. Так, в РФ БЦЖ прививаются около 95% детей, что означает, что у большинства из них ВТП укажет на потенциальное присутствие возбудителя туберкулеза, что на деле окажется ложноположительным результатом в большинстве случаев [5, 18]. Подводя итоги массовой туберкулинодиагностики, проведенной в Москве с 2000 по 2006 г., было подсчитано, что не более 1% от положительно ответивших на ВТП детей и подростков в итоге были взяты под диспансерное наблюдение. Специфичность ВТП составила 41,7% у детей и 22,2% у подростков. Сходные результаты были получены и в других субъектах [13]. Результаты другого сравнительного исследования показали, что каждый второй ребенок, получающий превентивную химиотерапию на основании результатов ВТП, может получать ее необоснованно [1].

Стоит отметить и достаточно высокую частоту ложноотрицательных результатов ВТП у отдельных групп лиц: пациентов с распространенным активным туберкулезом, у которых частота ложноотрицательных результатов ВТП может достигать 17% и дополнительно увеличиваться по мере возрастания тяжести инфекционного процесса; пациентов с ВИЧ, у которых частота ложноотрицательных результатов может достигать 28% при уровне CD4-клеток 400–500 кл/мкл и до 100% при уровне CD4-клеток менее 200 кл/мкл; у пожилых людей, у которых частота ложноотрицательных результатов может достигать 30%. К другим недостаткам этого теста относятся: низкая чувствительность у иммунокомпрометированных пациентов (например, у пациентов с ВИЧ), необходимость повторного посещения врача для интерпретации результатов [33]. Суммируя вышеперечисленные недостатки, можно сказать, что основной проблемой ВТП является высокая частота ложноположительных результатов, что приводит к проведению излишних медицинских манипуляций с пациентами и нерациональному расходованию медицинских ресурсов [5]. К положительным чертам ВТП можно отнести достаточно высокую изученность теста, а также сравнительно небольшую ресурсоемкость метода.

Недостатки ВТП и отсутствие альтернатив стимулировали проведение поиска новых методов диагностики ЛТИ. В 1996 г. было закончено секвенирование генома разных видов микобактерий и их сравнительный анализ позволил выявить наличие так называемых «регионов различий» (англ. region of difference, RD-1, RD-2 и т. д.) — фрагментов генома, обнаруженных лишь у части видов и отсутствующих у других [42]. На данный момент обнаружено не менее 20 таких регионов в геномах микобактерий. В геноме *M. tuberculosis* выявлены 14 «регионов

различий» (RD), которые также присутствуют лишь у ограниченного числа других видов микобактерий [37]. В теории гены обнаруженных регионов могли кодировать белки, отсутствующие у других видов микобактерий, соответственно обнаружение этих специфических белков указывало бы на присутствие в организме именно тех видов микобактерий, которые способны его продуцировать. Потенциально открытие таких белков позволило бы создать на их основе высокоспецифичные диагностические тесты [20].

Впоследствии был открыт целый ряд таких специфических белков (MPT51, MPT59 MPT64 (Ag85B, Rv1886c), MTB8, MTB48, Rv0934, Rv1837c и др.), однако результаты экспериментов подтвердили клиническую применимость лишь небольшого их числа. Проблема заключалась в том, что тесты на их основе не демонстрировали достаточного уровня чувствительности, что нивелировало их специфичность. Среди самых эффективных белков оказались ESAT-6 и CFP-10, гены которых находятся в RD-1. Тесты, основанные на комбинации этих белков, продемонстрировали более высокую чувствительность по сравнению с тестами на основе какого-либо одного из них, что предопределило их дальнейшее совместное использование [4, 42].

Тесты на основе рекомбинантных ESAT-6 и CFP-10 преодолели недостатки ВТП — благодаря возросшей специфичности на результаты тестирования перестало влиять наличие вакцинации БЦЖ в прошлом, снизилась частота ложноположительных результатов из-за реакции на нетуберкулезные микобактерии и т. д.

Диагностические тесты на основе ESAT-6 и CFP-10 имеют несколько форм реализации: тесты *in vitro*, выполняемые в лаборатории на основе биологического материала пациента (кровь), и внутрикожные пробы, аналогичные ВТП, отличающиеся применением ESAT-6 и CFP-10 вместо туберкулина.

IGRA-тесты

Исторически первыми появились лабораторные методы *in vitro*. Как и внутрикожные методы они основаны на механизме клеточного ответа: организм, в котором присутствуют микобактерии, способные вызвать туберкулез, сенсибилизирован к антигенам микобактерий, и иммунные клетки Т-клеточного звена, «знакомые» с антигеном, при встрече с ним запускают процесс воспаления [33]. При постановке внутрикожных проб воспаление проявляется характерным инфильтратом в месте введения. При лабораторном исследовании у пациента берется образец крови с циркулирующими в ней Т-лимфоцитами, затем в образец крови добавляется микобактери-

альный антиген или их смесь, которые при взаимодействии с сенсibilизированными Т-лимфоцитами провоцируют выделение ими $IFN\gamma$, который подвергается количественному анализу и при превышении пороговых значений указывает на наличие в организме активных микобактерий [20]. Тесты на основе этого принципа получили название IGRA-тесты (англ. interferon-gamma release assays). Первоначально, в качестве антигена применялся туберкулин, однако *in vitro* методы с его использованием характеризовались наличием практически тех же недостатков, за исключением того, что результаты получались быстрее, и не требовалось повторного посещения пациентом врача [33, 42]. С открытием антигенов, кодируемых в регионах различий, туберкулин был заменен на них. На данный момент в мире общепризнаны и широко применяются два валидированных IGRA-теста: T-SPOT.TB и QuantiFERON-TB Gold (QFT). Они отличаются друг от друга составом антигенов и критериями оценки результатов тестирования. При проведении T-SPOT.TB используются рекомбинантные антигены ESAT-6 и CFP-10. Образец крови пациента инкубируется течение 16–24 ч в присутствии антигенов, а затем при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) по методу ELISPOT проводится подсчет числа Т-лимфоцитов, выделяющих $IFN\gamma$ [27]. В качестве антигенов в тесте QFT выступают рекомбинантные ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4). Образец крови пациента подвергается центрифугированию с последующим инкубированием с антигенами в течение 16–24 ч. Уровень $IFN\gamma$ определяется с помощью ИФА по методу ELISA — путем подсчета выделенного $IFN\gamma$ [35].

Чувствительность IGRA-тестов при диагностике ЛТИ составляет около 68–90% для T-SPOT.TB и 46–80% для QFT. Оба теста обладают высокой и сопоставимой специфичностью > 95% [24, 32]. Для сравнения: чувствительность ВТП в среднем составляет около 80%, при этом если в качестве критерия положительной пробы использовать размер папулы 5, 10 или 15 мм, то чувствительность будет составлять около 98, 70–90 и 40–60% соответственно. Специфичность ВТП при диагностике ЛТИ у лиц без вакцинации БЦЖ может достигать 100%, но снижается до 60–80% при ее наличии [13, 24, 31, 32]. Важно отметить, что говоря о чувствительности и специфичности любого метода диагностики ЛТИ, необходимо учитывать, что все оценки являются приблизительными, так как золотого стандарта диагностики ЛТИ по-прежнему нет [3]. Не стоит также забывать, что высокие показатели диагностической ценности, продемонстрированные в условиях хорошо спланированного и проведенного эксперимента, не всегда достигаются в реальных условиях. Так, по замечанию авторов,

проанализировавших опыт применения IGRA-тестов в РФ, результаты их применения были несколько ниже, чем заявлено в международных рекомендациях [40].

Результаты крупного метаанализа исследований с участием пациентов из групп повышенного риска показали, что риск развития туберкулеза у лиц с положительным тестом превышает риск развития туберкулеза у лиц с отрицательным тестом в случае IGRA-тестов в 9,35 раз (95% доверительный интервал (ДИ) [6,48–13,49]), в то время как в случае ВТП — в 4,24 раза (95% ДИ [3,3–5,46]). Положительная диагностическая ценность (англ. positive predictive value) для IGRA-тестов и ВТП составила 4,2 и 1,6% соответственно, а негативная диагностическая ценность (англ. negative predictive value) — 99,4 и 99,1% соответственно. Риск развития туберкулеза у лиц с положительным результатом теста, не получивших профилактического лечения, превысил риск у лиц, получивших лечение, при использовании IGRA-тестов в 2,36 раза (95% ДИ [1,06–5,23]) и при использовании ВТП — 1,35 раза (95% ДИ [0,59–3,12]) Таким образом, было показано, что IGRA-тесты обладают большей предсказательной ценностью, чем ВТП [45].

В качестве аналога для замены более дорогого импортного теста QFT был разработан отечественный *in vitro* IGRA-тест на основе ESAT-6, CFP-10 и туберкулина, получивший название Тубинферон. Доказательная база данного теста ограничена и противоречива, что не позволяет сделать определенный вывод о диагностической ценности данного метода [7, 8, 9, 10]. Тубинферон разрабатывался как альтернатива QFT, поэтому в качестве косвенной оценки ценности нового метода можно использовать данные о частоте совпадений между двумя тестами. Так, по результатам параллельных исследований было установлено, что у детей результаты Тубинферона и QFT совпадали в 68% [7] и в 74,6% случаев (в то время как АТР и QFT совпадали в 90% случаев) [8]. При использовании QFT в качестве эталона чувствительность и специфичность Тубинферона в другом исследовании составила 64,7 и 75,9% соответственно [9]. На момент написания статьи тест не имеет действующего регистрационного удостоверения в РФ [16].

Внутрикожные пробы с ESAT-6 и CFP-10

Реализация ESAT-6/CFP-10-платформы в виде внутрикожных проб впервые была осуществлена в зарегистрированном в РФ диагностическом тесте на основе аллергена туберкулезного рекомбинантного (АТР, торговое наименование «Диаскинтест», ЛСР-006435/08, зарегистрирован 11.08.2008). В указанном тесте применяются не сами белки ESAT-6 и CFP-10, а единый реком-

бинантный белок, состоящий из ESAT-6 и CFP-10 и продуцируемый генетически модифицированной культурой *E. coli* BL21 (DE3)/pCFP-ESAT. Идея создания АТР заключалась в разработке более специфичного теста по сравнению с ВТП, но пригодного для массового скрининга [4].

АТР имеет более чем 10-летний опыт клинического применения. Суммарно в 121 публикации по результатам использования АТР, тест применен у 12 026 761 пациента, из которых не менее 4 млн — дети [40]. Анализ государственных закупок показал, что с 2013 г. по настоящее время было закуплено более 5 млн упаковок АТР, что в пересчете на дозы превышает 170 млн доз [17].

По результатам крупного метаанализа, включившего результаты 61 публикации по результатам применения АТР, общая точность АТР составляет 95,1% (95% ДИ [95,06–95,1]), у ВИЧ-положительных лиц — 92,4% (91,9–92,7). Чувствительность АТР у пациентов с туберкулезом составляет 86,0% (95% ДИ [80,0–92,0]) и 100% у детей с туберкулезом. Сопоставление частоты положительных проб у пациентов с туберкулезом показало, что при применении АТР (80,5%) они наблюдались чаще, чем при QFT (67,0%) и T-SPOT.TB (72,2%), но реже, чем при применении ВТП (91,2%). У пациентов с туберкулезом в сочетании с ВИЧ частота положительных результатов с АТР (59,3%) была на уровне с QFT (61,3%) и несколько ниже, чем при использовании T-SPOT.TB (67,2%), но значительно выше, чем при ВТП (15,1%) [40].

В другом крупном объединенном анализе 33 работ, из которых были извлечены данные о результатах применения АТР и ВТП у 2 126 493 детей, было установлено, что диагностическая ценность АТР выше в группе подростков с 15 до 18 лет, чем в группе детей от 0 до 14 лет. Расчетная чувствительность и специфичность АТР у подростков составила 100 и 97,9% соответственно, в то время как при применении ВТП — 100 и 10,2% соответственно [6].

В сравнительном исследовании АТР и QFT, в котором принял участие 181 человек, было показано, что у взрослых и детей с туберкулезом результаты обоих тестов достаточно согласованы: у взрослых чувствительность АТР и QFT составила 68 и 82% соответственно, а специфичность — по 88% при согласованности в результатах у 84% пациентов; у детей чувствительность составила 73 и 65%, а специфичность — 84 и 86%, при согласованности результатов у 90% детей. Также было отмечено, что в подгруппах детей с туберкулезом, вызванным *M. tuberculosis*, и высокоактивным туберкулезом чувствительность АТР достигла 100%, в отличие от QFT, показавшего результат 67 и 79%. Таким образом было продемонстрировано, что у взрослых чувствительность АТР несколько уступает QFT, однако,

напротив, у детей АТР оказался более чувствительным, но несколько менее специфичным [34].

Ретроспективный анализ 860 историй болезней детей и взрослых без ВИЧ, вакцинированных БЦЖ, прошедших обследование в ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии с использованием АТР, QFT и T-SPOT.TB, показал, что у детей наблюдается почти полная согласованность при использовании данных тестов: 100% у АТР и T-SPOT.TB, и 97,1% у АТР и QFT. В подгруппе взрослых результаты оказались менее согласованными — в 80,5% случаев между АТР и T-SPOT.TB и в 63,6% случаев между АТР и QFT. Рассчитанная чувствительность у взрослых с туберкулезом, вызванным *M. tuberculosis*, составила 88,7% для АТР, 90,6% для T-SPOT.TB и 87,0% для QFT. Согласно полученным результатам, АТР оказался сопоставим по своим диагностическим свойствам с QFT и T-SPOT.TB, при этом у детей наблюдалось почти 100%-ное совпадение результатов тестирования [41].

В литературе описаны следующие положительные изменения в диагностике туберкулеза, появившиеся после внедрения АТР: при диагностике локальных форм туберкулеза удалось повысить выявляемость на 22,9% и избежать гипердиагностики в 20,7% случаев [5]; значительно повысить выявляемость активного туберкулеза у детей и подростков от 1,75 до 24 и 37,7 раза [15, 14, 39]; значительно повысить выявляемость посттуберкулезных изменений у детей и подростков в 39,2 раза [14]; снизить частоту назначения превентивной химиотерапии в 5 раз (по сравнению с частотой назначения после положительного ответа на ВТП) и привести в итоге к снижению заболеваемости туберкулезом [14]. Было отмечено, что АТР может давать положительные результаты у детей с монотонной ВТП, которые вследствие этого не подлежали диспансерному наблюдению, что расширяет диагностические возможности для этой части популяции [2]. С помощью АТР возможно провести дифференциальную диагностику туберкулеза и поствакцинальных осложнений после вакцинации БЦЖ [4]. Специфичность АТР значительно превышает специфичность ВТП в случаях неактивного туберкулеза легочной и внелегочных локализаций, а также нетуберкулезных заболеваний внелегочной локализации — частота ложноположительных результатов при применении ВТП у таких пациентов достигает 70%. В целом применение АТР позволяет на 65–99% снизить частоту ложноположительных результатов с ВТП [4].

В настоящее время в клинической разработке находятся еще 2 диагностических теста на основе ESAT-6 и CFP-10: датский тест С-Тб, являющийся комбинацией ESAT-6 и CFP-10 в со-

отношении 1:1, и китайский, представляющий собой рекомбинантный белок ESAT-6—CFP-10.

По итогам исследования С-Тб частота положительных результатов среди здоровых пациентов, нечасто и часто контактирующих с больными туберкулезом, имеет высокую согласованность с QFT — результаты совпадают у 94% пациентов. В то же время у пациентов с туберкулезом частота положительных реакций на С-Тб составила лишь 67% против 81% на QFT и 90% на ВТП. Частота положительного ответа на С-Тб среди здоровых лиц составила 3% по сравнению с 22% при использовании ВТП, у лиц с нечастыми контактами — 16% по сравнению с 22% соответственно, и у лиц с частыми контактами — 43 и 51% соответственно [38].

В клинических исследованиях китайского теста оценивались разные дозировки белка ESAT-6—CFP-10, а также такие параметры как временной промежуток оценки, критерии оценки — размер папулы или размер эритемы. Полученные результаты показывают, что чувствительность нового теста составляет от 72,14 до 100%, а специфичность — от 89,83 до 97,49% [30, 44].

Вакцины на основе ESAT-6 и CFP-10

На данный момент единственной противотуберкулезной вакциной является вакцина БЦЖ, тем не менее в разработке находится не менее 25 вакцин. Часть из них содержит в своем составе ESAT-6 и/или CFP-10. Субъединичная вакцина АЕС/BC02 основана на рекомбинантном белке Ag85b-ESAT-6—CFP-10. Другие субъединичные вакцины, содержащие в составе ESAT-6, это H1:IC31, H1:CAF01, H1:LTK63, H56:IC31/AERAS-456. Не содержит в своем составе, но экспрессирует ESAT-6 живая вакцина ТВ/FLU-04L, основанная на векторе из вируса гриппа, экспрессирующего Ag85A и ESAT-6 [23, 26].

Несмотря на ожидаемую пользу от внедрения в клиническую практику новых противотуберкулезных вакцин возможно проявление и некоторых негативных последствий, связанных с сенсibilизацией к ESAT-6 и CFP-10. По аналогии с вакцинацией БЦЖ, из-за которой ВТП может давать ложноположительные результаты, применение вакцин на основе ESAT-6 и CFP-10 может снизить специфичность диагностических средств на их основе [28].

Обзор клинических рекомендаций

ВОЗ в своем документе 2018 г. настоятельно рекомендовала рассматривать ВТП и IGRA-тесты как равнозначные варианты, обладающие относительно одинаковыми преимуществами и недостатками при диагностике ЛТИ. Выбор

конкретного варианта следует делать исходя из экономических и инфраструктурных возможностей, доступных в конкретном случае [3].

В сводных рекомендациях Американского торакального общества (англ. American Thoracic Society), Американского общества инфекционистов (англ. Infectious Diseases Society of America) и Американского Центра по контролю и профилактике заболеваний (англ. Centers for Disease Control and Prevention) 2017 г. указано, что у детей до 5 лет предпочтительнее применять ВТП вместо IGRA-тестов. У детей старше 5 лет и взрослых с подозрением на ЛТИ, с низким и средним риском прогрессирования ЛТИ до активного туберкулеза, прошедших вакцинацию БЦЖ и у лиц, которые могут повторно не посетить врача для интерпретации результатов ВТП более предпочтительным является применение IGRA-тестов. При этом уточняется, что ВТП является надежной альтернативой, особенно в ситуациях, когда IGRA-тесты недоступны, дороги или их применение неприемлемо по иным причинам. У детей старше 5 лет и взрослых с подозрением на ЛТИ и высоким риском прогрессирования ЛТИ до активного туберкулеза возможно применение любого из тестов, так как данных о преимуществе одного перед другим недостаточно [22, 29].

Международное сообщество UpToDate в серии своих рекомендаций также предлагает дифференцированный подход к диагностике ЛТИ. У детей до двух лет рекомендуется использовать ВТП, у детей с 2 до 4 лет, особенно прошедших вакцинацию БЦЖ, предпочтительнее использование IGRA-тестов. У детей с 5 лет рекомендуется применение IGRA-тестов в ситуации, когда большую важность имеет специфичность теста — например у здоровых детей или прошедших вакцинацию БЦЖ. В ситуациях, когда важна чувствительность теста — дети с высоким риском ЛТИ или дети, нуждающиеся в иммуносупрессивной терапии, могут быть использованы и ВТП и IGRA-тесты [19, 31].

В РФ предпочтительным тестом на ЛТИ у взрослых является проба с АТР. IGRA-тесты рекомендуются лишь при отказе от проведения кожных тестов или невозможности их проведения по медицинским показаниям [11]. У детей тестирование с целью формирования групп высокого риска развития туберкулеза и диагностики заболевания рекомендуется использовать либо пробы с АТР, либо IGRA-тесты. При отборе детей для ревакцинации БЦЖ и при выявлении периода первичного инфицирования у детей до 7 лет включительно рекомендуется применение ВТП, а в возрасте 8–14 лет — применение пробы с АТР. У детей с подозрением на туберкулез для верификации диагноза в комплексное клиничко-лабораторное и рентгеноло-

гическое обследование рекомендуется включение пробы с АТР и/или IGRA-тестов [12].

Обзор клинических рекомендаций и руководств, предпринятый Европейским центром профилактики и контроля болезней (англ. European Centre for Disease Prevention and Control) в 2018 г. и объединивший в итоге 6 документов, опубликованных с 2010 по 2015 г. показал, что ни в одном из документов не предлагалось полного отказа от ВТП. В качестве единственного или в качестве предпочтительного ВТП по-прежнему рекомендуется у детей в возрасте до 5 лет. В общей популяции рекомендуются оба теста, при этом в странах с низким и средним уровнем доходов особенно не рекомендуется отказываться от ВТП. В качестве предпочтительного или в дополнение к ВТП IGRA-тесты часто рекомендуются в особых популяциях: у лиц с низким риском ЛТИ, прошедших вакцинацию БЦЖ, бездомных или употребляющих наркотические средства, иммигрантов из стран с высокой распространенностью туберкулеза, лиц с ВИЧ и другими состояниями, ассоциированными со снижением иммунитета [25].

Обсуждение

Изучение генома микобактерий, последующее открытие ESAT-6 и CFP-10 и разработка тест-систем на их основе внесли значительный вклад в совершенствование диагностики туберкулеза. Специфичность и высокая диагностическая информативность применения ESAT-6 и CFP-10 сочетаются с гибкостью в их технологическом применении: на их основе созданы и демонстрируют хорошие результаты тесты *in vitro* со смесью индивидуальных рекомбинантных белков, внутрикожные тесты как со смесью индивидуальных рекомбинантных белков, так и единым рекомбинантным белком ESAT-6–CFP-10. Разные формы реализации тест-систем позволяют выполнять и точный лабораторный анализ, и эффективный массовый скрининг. Многообещающие результаты также получены при испытаниях вакцин с ESAT-6 и CFP-10, что означает наличие у них потенциального иммуногенного эффекта у человека.

Обзор литературы продемонстрировал наличие значительной доказательной базы в отношении превосходящей эффективности тестов на основе ESAT-6 и CFP-10 по сравнению с ВТП при диагностике ЛТИ и в некоторых других ситуациях:

- применение тестов на основе ESAT-6 и CFP-10 при массовых скринингах в общей популяции позволяет значительно повысить выявляемость ЛТИ и активного туберкулеза

- по сравнению с ВТП. При этом заметно снижается частота ложноположительных результатов и последующих необоснованных назначений противотуберкулезной терапии, что также приводит и к экономии медицинских ресурсов;

- в странах с высокой частотой вакцинации БЦЖ применение тестов на основе ESAT-6 и CFP-10 позволяет в еще большей степени снизить частоту ложноположительных результатов при применении ВТП;

- тесты с ESAT-6 и CFP-10 в отличие от ВТП позволяют дифференцировать туберкулезный процесс и поствакцинальные осложнения прививки БЦЖ;

- повышается выявляемость пациентов с посттуберкулезными изменениями;

- появляется возможность отслеживать состояние пациентов с монотонной реакцией на ВТП;

- значительно повышается эффективность дифференцирования активного туберкулеза от неактивного туберкулеза как легочной, так и внелегочной локализации, а также нетуберкулезных заболеваний внелегочных локализаций;

- *in vitro* тесты с ESAT-6 и CFP-10 являются надежными альтернативами в ситуации, когда проведение внутрикожных тестов с туберкулином или ESAT-6 и CFP-10 противопоказано или не представляется возможным по другим причинам.

Изучение отечественных и иностранных клинических рекомендаций позволило установить, что тесты на основе ESAT-6 и CFP-10 в той или иной форме реализации присутствуют во всех рассмотренных документах. В некоторых ситуациях они рекомендуются в качестве альтернативы ВТП, а в иных — в качестве предпочтительных средств диагностики.

Как было сказано ранее, тесты на основе ESAT-6 и CFP-10 реализованы в разных форматах: тест-системы для *in vitro* диагностики и тесты для внутрикожного применения. *In vitro* тесты считаются более точными по сравнению с внутрикожными, при этом они дороже, требуют наличия лаборатории и квалифицированного специалиста. В качестве дополнительных преимуществ *in vitro* тестов часто выделяются быстрота получения результата и отсутствие необходимости в повторном посещении врача, однако на практике эти преимущества не всегда реализуются — при массовых скринингах преимущество в скорости теряется, а для получения пациентом результатов может потребоваться повторное посещение врача. Внутрикожные тесты с ESAT-6 и CFP-10 не предполагают каких-либо изменений в практике их применения по сравнению с ВТП, поэтому их внедрение

не требует дополнительных инфраструктурных или организационных мероприятий, а их более высокая стоимость по сравнению с ВТП компенсируется снижением расходов на диспансерное наблюдение или превентивное лечение людей за счет снижения частоты ложноположительных результатов. Таким образом, выбор в пользу *in vitro* или внутрикожных тестов следует делать исходя из клинической потребности и доступных ресурсов.

Заключение

Открытие антигенов ESAT-6 и CFP-10 позволило сделать первый и пока единственный прорыв в совершенствовании диагностики ЛТИ со времен внедрения самого первого теста

ВТП. Благодаря относительной нетребовательности молекул ESAT-6 и CFP-10 на их основе был разработан ряд достаточно разных по характеристикам медицинских продуктов: *in vitro* тест-системы с индивидуальными рекомбинантными белками, внутрикожные тесты с рекомбинантными индивидуальными белками и рекомбинантным комплексным белком, комплексные вакцины. В области диагностики ЛТИ совместное применение ESAT-6 и CFP-10 позволило компенсировать многие недостатки ВТП. ESAT-6 и CFP-10 являются единственными отдельными антигенами (не считая смеси антигенов в составе туберкулина), используемыми в диагностике туберкулеза и применяемыми во всем мире, что дополнительно подчеркивает важность их открытия.

Список литературы/References

1. Аксенова В.А., Барышник Л.А. Эффективность аллергена туберкулезного рекомбинантного при раннем выявлении туберкулезной инфекции у детей и подростков в условиях общей лечебной сети // Вопросы современной педиатрии. 2015. Т. 14, № 3. С. 358–362. [Aksenova V.A., Baryshnikova L.A. Efficacy of the recombinant tuberculosis allergen for early identification of latent tuberculosis in children and adolescents in general healthcare settings. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2015, vol. 14, no. 3, pp. 358–362. (In Russ.) doi: 10.15690/vsp.v14i3.1371]
2. Аксенова В.А., Леви Д.Т., Александрова Н.В., Кудлай Д.А., Барышник Л.А., Клевно Н.И. Туберкулез у детей: современные методы профилактики и ранней диагностики // Доктор.Ру. 2017. Т. 15, № 144. С. 9–15. [Aksenova V.A., Levi D.T., Aleksandrova N.V., Kudlay D.A., Baryshnikova L.A., Klevno N.I. Pediatric TB: modern methods for prevention and early diagnostics. *Doktor.Ru = Doctor.Ru*, 2017, vol. 15, no. 144, pp. 9–15. (In Russ.)]
3. Всемирная организация здравоохранения. Обновленное сводное руководство по программному ведению случаев латентной туберкулезной инфекции. Женева: Всемирная организация здравоохранения, 2018. 72 с. [Latent tuberculosis infection: updated and consolidated guidelines for programmatic management. *WHO*, 2018. 72 p. (In Russ.)]
4. Кожная проба с препаратом «Диаскинтест» — новые возможности идентификации туберкулезной инфекции. Под ред. М.А. Пальцева. 2-е изд., испр. и доп. М.: Шико, 2011. 256 с. [Skin test with the “Diaskintest” — new opportunities for the identification of tuberculosis infection. 2nd ed. Ed. by M.A. Pal'tsev. *Moscow: Shiko Publ.*, 2011. 256 p. (In Russ.)]
5. Козлова А.В., Лазарева Л.В., Вальц И.А. Анализ эффективности Диаскинтеста как метода верификации туберкулеза у детей // *Universum медицина и фармакология*. 2019. Т. 59, № 4. [Kozlova A.V., Lazareva L.V., Valts I.A. Analysis of efficiency of diaskintest as a method of verification of tuberculosis in children. *Universum medicina i farmakologiya = Universum Medicine and Pharmacology*, 2019, vol. 59, no. 4. (In Russ.)]
6. Кудлай Д.А., Старшинова А.А., Довгалюк И.Ф. Аллерген туберкулезный рекомбинантный: 10-летний опыт применения теста у детей и подростков в Российской Федерации (данные метаанализа) // Педиатрия. Журнал имени Г.Н. Сперанского. 2020. Т. 99, № 3. С. 121–129. [Kudlay D.A., Starshinova A.A., Dovgalyuk I.F. Recombinant tuberculosis allergen: 10 years of experience with the test in children and adolescents in the Russian Federation (meta-analysis data). *Pediatriya. Zhurnal imeni G.N. Speranskogo = Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky*, 2020, vol. 99, no. 3, pp. 121–129. (In Russ.)] doi: 10.24110/0031-403X-2020-99-3-121-129
7. Лозовская М.Э., Белушков В.В., Гурина О.П., Васильева Е.Б. Сравнительная оценка инновационных тестов в диагностике латентной и активной туберкулезной инфекции у детей // Педиатр. 2014. Т. 5, № 3. [Lozovskaya M.E., Belushkov V.V., Gurina O.P., Vasilyeva E.B. Comparative evaluation of innovative diagnostic tests for latent and active TB infection in children. *Pediatr = Pediatr*, 2014, vol. 5, no. 3. (In Russ.)] doi: 10.17816/PED5346-50
8. Лозовская М.Э., Белушков В.В., Гурина О.П., Дементьева Е.А., Шибак Н.Д., Васильева Е.Б., Клочкова Л.В. Сопоставление лабораторных тестов Quantiferon, Тубинферон и Диаскинтеста у детей с туберкулезной инфекцией // Клиническая лабораторная диагностика. 2016. Т. 61, № 12. С. 838–842. [Lozovskaya M.E., Belushkov V.V., Gurina O.P., Dementyeva E.A., Shibakova N.D., Vasilyeva E.B., Klochkova L.V. The comparison of laboratory tests Quantiferon, Tubiniferon and Diaskintest in children with tuberculosis infection. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2016, vol. 61, no. 12, pp. 838–842. (In Russ.)] doi: 10.18821/0869-2084-2016-61-12-838-842
9. Лозовская М.Э., Гурина О.П., Дементьева Е.А., Васильева Е.Б., Клочкова Л.В., Шибак Н.Д., Белушков В.В. Особенности реагирования тестов *in vitro* и кожных проб с туберкулезными аллергенами в зависимости от варианта туберкулезной инфекции у детей // Медицина теория и практика. 2018. Т. 3, № 3. С. 13–18. [Lozovskaya M.E., Gurina O.P., Dementyeva E.A., Vasilyeva E.B., Klochkova L.V., Shibakova N.D., Belushkov V.V. Features of reaction *in vitro* tests and skin tests with tubercular allergens depending on variants of the tuberculosis infection in children. *Medicina: teoriya i praktika = Medicine: Theory and Practice*, 2018, vol. 3, no. 3, pp. 13–18. (In Russ.)]
10. Мордовская Л.И., Гурьева О.И., Ильина, Е.Н., Тимофеева М.Н. Использование тест-системы «Тубинферон» и пробы с Диаскинтестом для диагностики туберкулеза органов дыхания у детей и подростков // Туберкулез и болезни лег-

- ких. 2014. № 8. С. 70–71. [Mordovskaya L.I., Gurieva O.I., Ilyina, E.N., Timofeeva M.N. Use of the «Tubinferon» test system and samples with Diaskintest for the diagnosis of respiratory tuberculosis in children and adolescents. *Tuberkulez i bolezni legkih = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2014, no. 8, pp. 70–71. (In Russ.)]
11. Общероссийская общественная организация «Российское общество фтизиатров». Клинические рекомендации. Туберкулез у взрослых. 2020, 121 с. [All-Russian public organization “Russian Society of Phthisiologists”. Clinical guidelines. Tuberculosis in adults. 2020. 121 p. (In Russ.)]
 12. Российское Общество Фтизиатров. Клинические рекомендации. Туберкулез у детей. 2020. 59 с. [Russian Society of Phthisiatricians. Clinical guidelines. Tuberculosis in children. 2020. 59 p. (In Russ.)]
 13. Слогоцкая Л.В., Богородская Е.М., Леви Д.Т., Сельцовский П.П. 10 лет кожной пробе с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскинтест) и 110 лет туберкулиновой пробе Манту — сравнение эффективности // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2017. Т. 17, № 2. С. 67–77. [Slogotskaya L.V., Bogorodskaya E.M., Levi D.T., Seltsovsky P.P. Comparison of efficacy of Diaskintest®, a skin test with a recombinant tuberculosis allergen, used for 10 years and Mantoux tuberculin sensitivity test used for 110 years. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2017, vol. 17, no. 2, pp. 67–77. (In Russ.)]
 14. Слогоцкая Л.В., Сенчихина О.Ю., Никитина, Г.В., Богородская Е.М. Эффективность кожного теста с аллергеном туберкулезным рекомбинантным при выявлении туберкулеза у детей и подростков Москвы в 2013 г. // Педиатрическая фармакология. 2015. Т. 12, № 1. С. 99–103. [Slogotskaya L.V., Senchikhina O.Yu., Nikitina G.V., Bogorodskaya E.M. Effectiveness of tuberculous recombinant allergen skin tests for detecting tuberculosis in children and adolescents of Moscow in 2013. *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology*, 2015, vol. 12, no. 1, pp. 99–103. (In Russ.)] doi: 10.15690/pf.v12i1.1255
 15. Сотнева И.Б. Опыт применения аллергена туберкулезного рекомбинантного для массового обследования на туберкулез детей и подростков в Нижегородской области // Вопросы практической педиатрии. 2017. Т. 12, № 4. С. 43–48. [Sotneva I.B. An experience of using recombinant tuberculosis allergen for mass screening for tuberculosis among children and adolescents in the Nizhny Novgorod region. *Voprosy prakticheskoy pediatrii = Clinical Practice in Pediatrics*, 2017, vol. 12, no. 4, pp. 43–48. (In Russ.)] doi: 10.20953/1817-7646-2017-4-43-48
 16. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзор). Тубинферон. ФСР 2011/11269, 2021. [Federal Service for Surveillance in Healthcare (Roszdravnadzor). Tubinferon. FSR 2011/11269, 2021. (In Russ.)] URL: <https://roszdravnadzor.gov.ru/services>
 17. Федеральное казначейство. Единая информационная система в сфере закупок, 2021. [Federal Treasury. Unified information system in the field of procurement, 2021. (In Russ.)] URL: <https://zakupki.gov.ru/epz/main/public/home.html>
 18. Шаповал И.Н. Здравоохранение в России. 2019: стат. сб. М.: Росстат, 2019. 170 с. [Shapoval I.N. Healthcare in Russia. 2019: statistical collection. *Moscow: Rosstat*, 2019. 170 p. (In Russ.)]
 19. Adams L.V., Starke J.R. Latent tuberculosis infection in children. *UpToDate*, 2018. 12 p.
 20. Andersen P., Munk M.E., Pollock J.M., Doherty T.M. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*, 2000, vol. 356, no. 9235, pp. 1099–1104. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02742-2
 21. Campbell J.R., Winters N., Menzies D. Absolute risk of tuberculosis among untreated populations with a positive tuberculin skin test or interferon-gamma release assay result: systematic review and meta-analysis. *Br. Med. J.*, 2020, vol. 368: m549. doi: 10.1136/bmj.m549
 22. Croke L.M. Tuberculosis: guidelines for diagnosis from the ATS, IDSA, and CDC. *Am. Fam. Physician.*, 2018, vol. 97, no. 1, pp. 56–58.
 23. Da Costa C., Walker B., Bonavia A. Tuberculosis vaccines — state of the art, and novel approaches to vaccine development. *Int. J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 32, pp. 5–12. doi: 10.1016/j.ijid.2014.11.026
 24. Doan T.N., Eisen D.P., Rose M.T., Slack A., Stearnes G. Interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection: a latent-class analysis. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 11: e0188631. doi: 10.1371/journal.pone.0188631
 25. European Centre for Disease Prevention and Control. Review of reviews and guidelines on target groups, diagnosis, treatment and programmatic issues for implementation of latent tuberculosis management. *Stockholm: ECDC*, 2018. 127 p.
 26. Gong W., Liang Y., Wu X. The current status, challenges, and future developments of new tuberculosis vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2018, vol. 14, no. 7, pp. 1697–1716. doi: 10.1080/21645515.2018.1458806
 27. Jurčev-Savičević A., Katalinić-Janković V., Miše K., Gudelj I. The role of interferon-gamma release assay in tuberculosis control. *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 2012, vol. 63, no. 1, pp. 49–58. doi: 10.2478/10004-1254-63-2012-2134
 28. Lalvani A., Whitworth H.S. Progress in interferon-gamma release assay development and applications: an unfolding story of translational research. *Ann. Transl. Med.*, 2019, vol. 7 (suppl. 3). doi: 10.21037/atm.2019.05.76
 29. Lewinsohn D.M., Leonard M.K., LoBue P.A., Cohn D.L., Daley C.L., Desmond E., Keane J., Lewinsohn D.A., Loeffler A.M., Mazurek G.H., O’Brien R.J., Pai M., Richeldi L., Salfinger M., Shinnick T.M., Sterling T.R., Warshauer D.M., Woods G.L. Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention clinical practice guidelines: diagnosis of tuberculosis in adults and children. *Clin. Infect. Dis.*, 2017, vol. 64, no. 2, pp. e1–e33. doi: 10.1093/cid/ciw778
 30. Li F., Xu M., Qin C., Xia L., Xiong Y., Xi X., Fan X., Gu J., Pu J., Wu Q., Lu S., Wang G. Recombinant fusion ESAT6-CFP10 immunogen as a skin test reagent for tuberculosis diagnosis: an open-label, randomized, two-centre phase 2a clinical trial. *Clin. Microbiol.*, 2016, vol. 22, no. 10, pp. 889.e9–889.e16. doi: 10.1016/j.cmi.2016.07.015
 31. Menzies D. Approach to diagnosis of latent tuberculosis infection (tuberculosis screening) in adults. *UpToDate*, 2018. 15 p.
 32. Menzies D. Use of interferon-gamma release assays for diagnosis of latent tuberculosis infection (tuberculosis screening) in adults. *UpToDate*, 2018, 12 p.
 33. Menzies D., Schwartzman K., Pai M. Immune-based tests for tuberculosis. *Tuberculosis*, 2009, pp. 179–196.
 34. Nikitina I.Y., Karpina N.L., Kasimceva O.V., Gergert V.Y., Ergeshov A., Lyadova I.V. Comparative performance of QuantiFERON-TB Gold versus skin test with tuberculosis recombinant allergen (Diaskintest) among patients with suspected pulmonary tuberculosis in Russia. *Int. J. Infect. Dis.*, 2019, vol. 86, pp. 18–24. doi: 10.1016/j.ijid.2019.06.014

35. Pai M., Kalantri S., Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part I. Latent tuberculosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2006, vol. 6, no. 3, pp. 413–422. doi: 10.1586/14737159.6.3.413
36. Refai A., Gritli S., Barbouche M.R., Essafi M. Mycobacterium tuberculosis virulent factor ESAT-6 drives macrophage differentiation toward the pro-inflammatory M1 phenotype and subsequently switches it to the anti-inflammatory M2 phenotype. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2018, vol. 8: 327. doi: 10.3389/fcimb.2018.00327
37. Ru H., Liu X., Lin C., Yang J., Chen F., Sun R., Zhang L., Liu J. The impact of genome region of difference 4 (RD4) on mycobacterial virulence and BCG efficacy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, vol. 7: 239. doi: 10.3389/fcimb.2017.00239
38. Ruhwald M., Aggerbeck H., Gallardo R.V., Hoff S.T., Villate J.I., Borregaard B., Martinez J.A., Kromann I., Penas A., Anibarro L.L., de Souza-Galvão M.L., Andersen P., Caylá J.A. Safety and efficacy of the C-Tb skin test to diagnose Mycobacterium tuberculosis infection, compared with an interferon γ release assay and the tuberculin skin test: a phase 3, double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Respir.*, 2017, vol. 5, no. 4, pp. 259–268. doi: 10.1016/S2213-2600(16)30436-2
39. Slogotskaya L., Bogorodskaya E., Sentchichina O., Ivanova D., Nikitina G., Litvinov V., Seltsovsky P., Kudlay D., Nikolenko N., Borisov S. Effectiveness of tuberculosis detection using a skin test with allergen recombinant (CFP-10-ESAT-6) in children. *Eur. Respiratory Soc.*, 2015, vol. 46: PA4524. doi: 10.1183/13993003.congress-2015.PA4524
40. Starshinova A., Dovgalyk I., Malkova A., Zinchenko Y., Pavlova M., Belyaeva E., Basantsova N., Nazarenko M., Kudlay D., Yablonskiy P. Recombinant tuberculosis allergen (Diaskintest®) in tuberculosis diagnostic in Russia (meta-analysis). *Int. J. Mycobacteriology*, 2020, vol. 9, no. 4: 335. doi: 10.4103/ijmy.ijmy_131_20
41. Starshinova A., Zhuravlev V., Dovgaluk I., Pantelev A., Manina V., Zinchenko U., Istomina E., Pavlova M., Yablonskiy P. A comparison of intradermal test with recombinant tuberculosis allergen (diaskintest) with other immunologic tests in the diagnosis of tuberculosis infection. *Int. J. Mycobacteriol.*, 2018, vol. 7, no. 1, pp. 32–39. doi: 10.4103/ijmy.ijmy_17_18
42. Van Pinxteren L.A., Ravn P., Agger E.M., Pollock J., Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2000, vol. 7, no. 2, pp. 155–160. doi: 10.1128/CDLI.7.2.155-160.2000
43. Welin A., Björnsdóttir H., Winther M., Christenson K., Oprea T., Karlsson A., Forsman H., Dahlgren C., Bylund J. CFP-10 from Mycobacterium tuberculosis selectively activates human neutrophils through a pertussis toxin-sensitive chemotactic receptor. *Infect. Immun. Am. Soc. Microbiol.*, 2015, vol. 83, no. 1, pp. 205–213. doi: 10.1128/IAI.02493-14
44. Zhang H., Wang L., Li F., Lu S., Xia J. Induration or erythema diameter not less than 5 mm as results of recombinant fusion protein ESAT6-CFP10 skin test for detecting M. tuberculosis infection. *BMC Infect. Dis.*, 2020, vol. 20: 685. doi: 10.1186/s12879-020-05413-9
45. Zhou G., Luo Q., Luo S., Teng Z., Ji Z., Yang J., Bao F. Interferon- γ release assays or tuberculin skin test for detection and management of latent tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 12, pp. 1457–1469. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30276-0

Авторы:

Кудлай Д.А., д.м.н., профессор кафедры фармакологии Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины и молекулярной иммунологии ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия;
Докторова Н.П., к.м.н., научный сотрудник ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний Минздрава России, Москва, Россия.

Authors:

Kudlay D.A., PhD, MD (Medicine), Professor of Pharmacology Department, Institute of Pharmacy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Leading Researcher, Laboratory of Personalized Medicine and Molecular Immunology, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation;
Doktorova N.P., PhD, MD (Medicine), Researcher, National Medical Research Center for Phthiopulmonology and Infectious Diseases, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 02.07.2021
 Принята к печати 15.02.2022

Received 02.07.2021
 Accepted 15.02.2022

КОНВЕРГЕНЦИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ГИПЕРВИРУЛЕНТНОСТИ У *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

В.А. Агеевец, И.В. Агеевец, С.В. Сидоренко

ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Начиная с 2018 г. в России описываются изоляты *Klebsiella pneumoniae*, демонстрирующие конвергенцию гипервирулентных свойств и множественной резистентности к антибиотикам. Проблема гипервирулентного патотипа клебсиелл актуализирована относительно недавно, его начали описывать в восьмидесятых годах в Тихоокеанском регионе. Эти клебсиеллы способны вызывать серьезные внебольничные инфекции у здоровых людей, чем принципиально отличаются от клебсиелл классического патотипа, и изначально они сохраняли чувствительность к большинству антибактериальных препаратов. В 2018–2020 гг. появились сообщения о выделении гипервирулентных изолятов *K. pneumoniae* в Российской Федерации. Гипервирулентность, так же как и множественная резистентность, связана с приобретением дополнительного генетического материала и формированием генетических линий, эффективно поддерживающих эти приобретенные детерминанты. Долгое время было принято считать, что конвергенция свойств множественной резистентности и гипервирулентности маловероятна из-за слишком большого генетического груза, а также разных экологических стратегий одного вида. Распространение гипервирулентных штаммов, в первую очередь, в азиатском регионе, связано с консервативными плазмидами «группы» pLVPK. Консервативность как самих первоначально обнаруженных плазмид вирулентности (типа pLVPK и pK2044), так и генетических линий с ними связанных (преимущественно CG23), вероятно, определяется отсутствием у данных плазмид кластера генов, отвечающих за конъюгацию. Драйвером распространения неконъюгативных плазмид с детерминантами гипервирулентности является клональное распространение, а не горизонтальный перенос генов. Тем не менее после достаточно долгого периода циркуляции плазмид с маркерами гипервирулентности (описываются начиная с 1986 г.) у клебсиелл некоторых генетических линий, произошли события мобилизации детерминант гипервирулентности и, как следствие, включение их в горизонтальный перенос генов в популяции (описанные случаи в 2016 г.), что привело к резкому расширению числа генетических линий и вариантов генетических платформ, несущих гены гипервирулентности. Первые случаи в России hv-MDR-Kpn описаны в 2018 г. в Москве на основе анализа коллекции клебсиелл, собранных в 2012–2016 гг. В 2020 и 2021 гг. описаны подобные случаи в Санкт-Петербурге. В случае повторения пессимистичного сценария, который наблюдался последние десять лет в связи с распространением карбапенемаз, эффективности здравоохранения будет нанесен более чем существенный вред.

Ключевые слова: *Klebsiella sp.*, гипервирулентность, множественная резистентность, гибридный патотип, мобильные генетические элементы, эпидемиология.

Адрес для переписки:

Агеевец Владимир Андреевич
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 9,
ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России.
Тел.: 8 911 951-00-97 (моб.).
E-mail: ageevets@list.ru

Contacts:

Vladimir A. Ageevets
197022, Russian Federation, St. Petersburg, Professor Popov str., 9,
Paediatric Research and Clinical Centre for Infectious Diseases.
Phone: +7 911 951-00-97 (mobile).
E-mail: ageevets@list.ru

Для цитирования:

Агеевец В.А., Агеевец И.В., Сидоренко С.В. Конвергенция множественной резистентности и гипервирулентности у *Klebsiella pneumoniae* // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 450–460. doi: 10.15789/2220-7619-COM-1825

Citation:

Ageevets V.A., Ageevets I.V., Sidorenko S.V. Convergence of multiple resistance and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 450–460. doi: 10.15789/2220-7619-COM-1825

Работа поддержана грантом РФФ № 18-75-10117.

This work was supported by the Russian Science Foundation grant no. 18-75-10117.

CONVERGENCE OF MULTIPLE RESISTANCE AND HYPERVIRULENCE IN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Ageevets V.A., Ageevets I.V., Sidorenko S.V.

Paediatric Research and Clinical Centre for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Since 2018, *Klebsiella pneumoniae* isolates have been described in Russia, demonstrating the convergence of hypervirulent properties and multiple antibiotic resistance. The problem of the *Klebsiella* hypervirulent pathotype has been actualized relatively recently that was progressively described in the 1980s in the Pacific region. These *Klebsiella* spp. can cause serious community-acquired infections in healthy people, which fundamentally differs from the classic *Klebsiella* pathotype initially preserving sensitivity to most antibacterial drugs. In 2018–2020, there were reported detection of hypervirulent *K. pneumoniae* isolates in the Russian Federation. Like multiple resistance, hypervirulence is associated with the acquiring additional genetic material and formation of genetic lineages that effectively support such acquired determinants. For a long time, it was believed that the convergence of multiple resistance and hypervirulence is unlikely due to a large genetic burden as well as different ecological strategies in same species. The spread of hypervirulent strains, primarily in the Asian region, is associated with the conserved plasmids of the pLVPK “group”. The conservatism of both the originally discovered virulence plasmids (such as pLVPK and pK2044) and the genetic lineages associated with them (mainly CG23) is probably determined by the absence of a gene cluster responsible for conjugation in these plasmids. The driver of the spread of non-conjugative plasmids with determinants of hypervirulence is clonal spread, not horizontal gene transfer. Nevertheless, after a sufficiently long period of circulation of plasmids bearing markers of hypervirulence (described since 1986) in *Klebsiella*, a relatively limited number of genetic lineages, there were events of mobilization of the determinants of hypervirulence and, as a consequence, the inclusion in horizontal gene transfer in the population (described cases in 2016), which led to a sharp increase in the number of genetic lineages and variants of genetic platforms carrying hypervirulence genes. In Russia, first cases of hv-MDR-Kpn were described in 2018 in Moscow based on analyzing collection of *Klebsiella* isolated in 2012–2016. In 2020 and 2021, similar cases were described in St. Petersburg. In case of repeated pessimistic scenario observed over the last decade due to spread of carbapenemases, effectiveness of health care will be more than substantially harmed.

Key words: *Klebsiella* sp., hypervirulence, multi-drug resistance, hybrid pathotype, mobile genetic elements, epidemiology.

Введение

Klebsiella pneumoniae (Kp) относится к широко распространенным в окружающей среде (почве и воде) бактериям, она также является постоянным компонентом микробиоты желудочно-кишечного тракта человека, но при этом способна вызывать широкий спектр заболеваний различной степени тяжести как у иммунокомпromетированных, так и компетентных лиц. Поскольку этот вид бактерий не однороден по основным свойствам, принято выделять два патотипа клебсиелл: классические (сKp) и гипервирулентные (hvKp).

Классический патотип является глобально распространенным, именно эти клебсиеллы являются оппортунистами здоровых людей и ведущими возбудителями нозокомиальных инфекций. Они часто демонстрируют множественную резистентность к антибиотикам. Начиная с 2012 г. в России выявляются изоляты Kp, несущие гены карбапенемаз преимущественно NDM-, OXA-48- и реже KPC-типов, причем за прошедшее десятилетие доля таких изолятов в отделениях ОРИТ выросла от единичных случаев до 50%.

Проблема гипервирулентного патотипа клебсиелл актуализирована относительно недавно, его начали описывать в восьмидесятых годах в Тихоокеанском регионе (Тайвань,

Сингапур, Китай). Эти клебсиеллы способны вызывать серьезные внебольничные инфекции у здоровых людей, чем принципиально отличаются от клебсиелл классического патотипа, и изначально они сохраняли чувствительность к большинству антибактериальных препаратов. В 2018–2020 гг. появились сообщения о выделении гипервирулентных изолятов *K. pneumoniae* в Российской Федерации.

Гипервирулентность, так же как и множественная резистентность, связана с приобретением дополнительного генетического материала и формированием генетических линий, эффективно поддерживающих эти приобретенные детерминанты. Долгое время было принято считать, что конвергенция свойств множественной резистентности и гипервирулентности маловероятна из-за слишком большого генетического груза, а также разных экологических стратегий одного вида, в рамках которых приобретение новых детерминант играет адаптационную роль. Однако в 2018 г. увидела свет первая публикация, посвященная появлению клебсиелл, проявляющих одновременно признаки множественной устойчивости и гипервирулентности [15]. На сегодняшний день очевидно существование нескольких генетических путей конвергенции этих признаков. Наибольшая опасность связана с конвергенцией гипервирулентности и устойчивости к карбапенемным

антибиотиками. Настоящий обзор посвящен рассмотрению проблем распространения и механизмов данного явления.

Появление гипервирулентных *K. pneumoniae*

Современная микробиология столкнулась с hvKp в 1986 г., когда появилась публикация [27] о семи клинических случаях нетипичной клебсиеллезной инфекции. У пациентов были выявлены абсцессы печени, менингиты, абсцесс простаты, причем все пациенты были условно здоровыми, если не считать сахарного диабета (у 4 из 7 пациентов). Также у пациентов наблюдалось формирование нескольких очагов инфекции по типу метастазов. В последующей серии работ было показано, что штаммы, вызывавшие указанные инфекции, отличались низкими значениями LD₅₀ (< 10³ КОЕ) при инфицировании у мышей, были способны расти при низких концентрациях железа в питательной среде и продуцировали аэробактин, ген которого был локализован на крупной плазмиде (180 тпо); для них был также характерен гипермукоидный фенотип, связанный с геном *rmrA* (regulator of mucoid phenotype) [30, 31, 32].

Однако вопрос о времени появления hvKp остается нерешенным. В 1882 г. немецкий микробиолог Карл Фридендер описал возбудителя тяжелых пневмоний (*Bacillus mucosus capsulatus*, *Bacillus friedlanderi*) с уровнем летальности 80%, который в настоящее время идентифицируется как *K. pneumoniae* [3, 18, 21, 33]. В отличие от пневмококковой пневмонии, кроме высокой летальности, пневмония Фридендера также часто сопровождалась деструкцией легочной ткани, кавитацией и формированием внелегочных очагов инфекции, а возбудитель проявлял гипермукоидный фенотип и вызывал высокую летальность мышей при экспериментальных инфекциях. Перечисленные признаки указывают на сходство *Bacillus friedlanderi* с современными hvKp [37]. Значительный интерес представляют данные о том, что генетическая линия «клональная группа (CG) 23-I», к которой относятся изоляты, выделенные при абсцессах печени и несущие гены вирулентности, сформировалась в конце XIX в. и начала глобально распространяться в 20-х гг. XX в. [20]. Остается неясной причина практически полного отсутствия сообщений о гипервирулентных клебсиеллах до 80-х гг.

Факторы вирулентности клебсиелл

Факторы вирулентности *K. pneumoniae* можно разделить на две большие группы, присутствующие у всех представителей данного

вида, и выявляемые преимущественно у гипервирулентного патотипа. К факторам первой группы относятся К- и О-антигены, участвующие в защите от иммунного ответа, фимбрии, участвующие в процессах адгезии, образовании биопленок и других начальных этапах инфекции, а также некоторые сидерофоры — соединения, обеспечивающие доставку ионов металлов из внешней среды внутрь клетки.

Поверхностные антигены. К-антиген — это историческое название капсульного полисахарида, формирующего слой, защищающий клетку от внешних воздействий. Аналогичные капсульные полисахариды есть у многих грамположительных и грамотрицательных бактерий [1, 29]. Серологически у клебсиелл выделяют 79 вариантов К-антигенов [34], однако из-за нестандартности процедуры, перекрестных реакций и большого количества нетипируемых изолятов, серотипирование практически полностью вытеснено молекулярным типированием, основанным на анализе локуса, ответственного за синтез капсульных полисахаридов (*cps* — capsular polysaccharide synthesis). Локус состоит из центрального вариабельного региона и двух фланкирующих консервативных регионов [55]. Серологическая специфичность определяется генами вариабельного региона, ответственными за сборку субъединиц полисахарида. Анализ структуры *cps*-локуса выявил генетические типы, четко связанные с серотипами. Кроме этого, выявлено значительное количество генетических вариантов (типов), не связанных с известными серотипами, а общее количество капсульных типов превышает 130. Актуальна номенклатура, согласно которой для обозначения серологических капсульных типов используется буква «К», а для генетически выявляемых вариантов используется аббревиатура «KL». Так серотипу К-1 соответствует генетический локус KL-1 [55]. К наиболее распространенным К-типам относят K1, K2, K5, K16, K23, K27, K28, K54, K62 и K64 [13]. Гипервирулентные клебсиеллы наиболее часто имеют K1 и K2 антигены, которые, вероятно, в сочетании с другими детерминантами обеспечивают наиболее вирулентные свойства [14, 47]. Другие К-типы, также описываемые у гипервирулентных клебсиелл, это K5, K20, K47, K54, K57 и K64 [38, 44, 57], хотя число описаний постоянно растет и разнообразие К-типов гипервирулентных клебсиелл также будет расти благодаря горизонтальному переносу генов.

О-антиген, являющийся фрагментом липополисахарида (ЛПС), представлен ограниченным числом вариантов, отличающихся составом сахаров, гликозидных связей, эпимерных или энантиомерных форм («зеркальные отражения» или «частично зеркальные») сахаров [9,

13]. Номенклатура О-антигенов и соответственно О-типов клебсиелл включает 11 вариантов: O1, O2a, O2ac, O2afg, O2aeh (ранее O9), O3 (разделяется на три подгруппы O3, O3a и O3b), O4, O5, O7, O8 и O12. О-антиген является важным антигеном и, аналогично капсульным антигенам, потенциально является мишенью для создания клебсиеллезных вакцин [2]. Следует отметить, что высокие риски, связанные с послеоперационными осложнениями из-за циркуляции внутрибольничных клебсиелл, в том числе гипервирулентных, делают внедрение в практику клебсиеллезной вакцины для пациентов, ожидающих плановые операционные вмешательства, актуальным направлением.

Фимбрии. Фимбрии представляют собой поверхностные структуры 0,5–10 мкм в длину и 2–8 нм в ширину и встречаются у большинства грамотрицательных бактерий. В большинстве случаев клинические изоляты *K. pneumoniae* имеют два типа фимбрий — первого и третьего типов [23]. Также описаны фимбрии Крс-типа, играющие роль в процессе биопленкообразования [53], и фимбрии KPF-28 (по названию антигена) [10].

Фимбрии первого типа выполняют различную роль в зависимости от среды, где происходит рост бактериальных клеток. Экспрессия генов оперона *fimAICDFGHK* растет в условиях инфекции мочевого пузыря и, наоборот, ингибируется при инфекции легких [4, 42, 46]. На модели инфекции мочевыводящих путей у мышей показано, что фимбрии первого типа играют роль в формировании биопленок.

Фимбрии третьего типа кодируются генами оперона *mrkABCDF*. Стоит отметить ген *mrkD*, кодирующий белок, локализованный на кончике фимбрии и отвечающий за специфичность адгезии всего комплекса. Среди различных штаммов клебсиелл можно обнаружить гены плазмидной локализации *mrkDIP* и хромосомно-локализованные гены *mrkDIC*, которые кодируют белки с разными функциями. Хромосомно-локализованный ген *mrcD* из кластера *mrkABCDF* отвечает за адгезию к коллагену внеклеточного матрикса и строго ассоциирован с образованием биопленок, в то время как белок, кодируемый геном с плазмидной локализацией *mrkDIP*, связан с гемагглютинирующей активностью [40].

Сидерофоры. Как для бактерий, так и для организма хозяина, ионы металлов, в частности железа, являются лимитирующим фактором, необходимым для нормального метаболизма. Снижение концентрации железа в очаге инфекции является формой неспецифического иммунного ответа, приводящего к снижению эффективности работы металлоферментов бактерий. Фактически, бактерия и организм хозяина

конкурируют за ионы железа. Редким направлением адаптации бактерии к существованию в организме человека является утрата генов, кодирующих железозависимые ферменты, например, *Borrelia burgdorferi* и *Treponema pallidum* [35]. Сидерофоры представляют собой низкомолекулярные соединения, синтезирующиеся внутри клетки и экспортирующиеся во внешнюю среду. Во внешней среде сидерофоры связывают ионы железа, после чего комплекс «железо–сидерофор» импортируется обратно в бактериальную клетку. Комплекс «железо–сидерофор» распознается специфичными рецепторами внешней мембраны, транспортирующими соответствующий материал в периплазму, где сидерофоры соединяются с белками периплазмы, после чего они транспортируются к внутренней мембране. Наконец, железо через АВС-транспортер попадает в бактериальную цитоплазму, где трехвалентное железо восстанавливается до двухвалентного железа, которое уже включается в метаболизм бактериальной клетки [7]. Клебсиеллы продуцируют как минимум четыре типа сидерофоров. Энтеробактин (кластер генов локализован на хромосоме) продуцируется всеми клебсиеллами, однако его эффективность как транспортера железа невысока, так как он инактивируется эукариотическим белком липокаин 2. Иерсиниобактин (хромосомная локализация) встречается как у классических, так и у гипервирулентных изолятов, но среди последних чаще. И, наконец, сальмохелин (плазмидно-локализованные гены *iroN* — рецептор сальмохеллина, *iroD* — эстераза, *iroC* — АВС-транспортер, *iroB* — гликозилтрансфераза) и аэробактин (плазмидно-локализованные гены *iucA* — аэробактин синтетаза, *iucB* — N-ацетилтрансфераза, *iucC* — синтетаза, *iutD* — лизин-6-монооксигеназа, *iutA* — рецептор связанного с железом аэробактина) характерны для гипервирулентных изолятов. Суммарная продукция сидерофоров коррелирует с уровнем вирулентности штамма: так, гипервирулентные штаммы демонстрируют продукцию сидерофоров в 8–10 раз выше, чем классические клебсиеллы [39].

Детекция гипервирулентности

Экспериментальные инфекции. Практическая потребность в быстрой лабораторной детекции hνKp очевидна, однако однозначных и общепринятых фенотипических и генетических критериев для дифференцировки сKp и hνKp в настоящее время не существует. Очевидно, что наиболее важными параметрами должны считаться тяжесть течения и исход болезни у человека. Однако клиническую картину, характерную для hνKp, могут вызывать и сKp,

что обуславливает необходимость в дополнительных маркерах вирулентности. Для оценки вирулентности клебсиелл используют экспериментальную инфекционную модель на мышах. Однако ни путь заражения (подкожный, аэрозольный или интраперитонеальный), ни генетические линии мышей не стандартизованы. При оценке коллекции hvKp, выделенных от амбулаторных пациентов с инвазивными инфекциями (абсцессы печени, некротизирующие фасцииты, эндофтальмиты) на модели подкожного инфицирования аутобредных CD1 мышей удалось выявить три группы штаммов в зависимости от величины летальной дозы: высоко вирулентные (летальная доза < 10³ КОЕ), вирулентные (летальная доза 10⁴–10⁵ КОЕ) и классические или авирулентные (отсутствие летальности при 10⁶ КОЕ) [23]. В качестве альтернативы мышинной модели одно время рассматривали инфекцию личинок восковой моли (*Galleria mellonella*), однако получаемые данные зачастую были противоречивы. Недавно проведенное исследование по сравнению инфекционных моделей hvKp инфекции на аутобредных мышах и личинках *Galleria mellonella* доказало несостоятельность личиночной модели для измерения потенциала вирулентности штаммов клебсиелл [36].

Гипервирулентность, гипермукоидность и стринг-тест. Яркой отличительной чертой, описанной Карлом Фридендером еще в конце XIX в. и позже подмеченной современными микробиологами, является гипермукоидный фенотип большинства гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae*. Высокий уровень ассоциированности гипермукоидного фенотипа и гипервирулентности привели к тому, что фактически эти понятия стали использоваться как синонимы. Тем не менее это не всегда верно. Во-первых, не все гипермукоидные клебсиеллы гипервирулентны, во-вторых, не все гипервирулентные клебсиеллы гипермукоидны. Для дифференцировки мукоидного и гипермукоидного фенотипов используют стринг-тест, заключающийся в способности колонии образовывать тяжи длиной более 5 мм при захвате колонии микробиологической петлей. Зачастую, гипермукоидные штаммы способны образовывать тяжи длиной 10 см и более. Степень ассоциированности этого морфологического признака с гипервирулентностью до 90% [38, 52], что делает стринг-тест важным диагностическим инструментом, но недостаточным для достоверной дифференцировки классического и гипервирулентного патотипов.

Наиболее важные результаты по оценке значимости около 20-ти различных маркеров гипервирулентности получены в работе Russo T.A. и соавт. [38]. Было показано, что с высокой ви-

рулентностью на модели сепсиса у мышей коррелируют наличие у штаммов генов *peg-344*, *iroB*, *iucA*, *rmpA*, и *rmpA*, а также высокий уровень продукции сидерофоров (≥ 30 мгк/мл).

Гипервирулентность, проявляющаяся в септических моделях или особенностях течения заболевания, определяется комбинациями ряда признаков и свойств изолятов. Среди маркеров для четкой дифференцировки патотипов предлагаются различные комбинации фенотипических признаков и/или генов, например, положительный тест по двум из трех маркеров: стринг-тест (тянущиеся слизистые тяжи более 5 мм за петлей); наличие гена *rmpA*, продукция аэробактина [54] или же количественно высокая продукция сидерофоров. Перечень маркеров включает около двух десятков генов, каждый из которых с высокой частотой ассоциирован с гипервирулентным патотипом, но ни один из них не обладает 100% специфичностью.

Генетические линии гипервирулентных *K. pneumoniae*

Первые описания гипервирулентных клебсиелл были связаны с ограниченным числом генетических линий, относящихся к клональной группе CG23 (clonal group 23 согласно схеме MLST (multi-locus sequence typing) типирования) [5], но попытки выделить клональные группы, позволяющие дифференцировать патотипы, не увенчались успехом [6]. Представители отдельных клональных групп представлены в популяции как гипервирулентными, так и классическими патотипами клебсиелл, и широко распространены в разных частях мира [6, 16, 19, 25, 28, 57]. Тем не менее гипервирулентные клебсиеллы наиболее часто представлены в CG23 и связаны с определенными серотипами — K1, K2, K54. Указанные серотипы наиболее устойчивы к фагоцитозу [56] и наиболее вирулентны при наличии аналогичного набора генов вирулентности по сравнению с другими серотипами. Однако, вероятнее всего, перечень как клональных групп, так и серотипов, связанных с гипервирулентностью, будет со временем расширяться [6, 16, 37, 57]. Так как именно K1 и K2 серотипы наиболее часто связаны с гипервирулентными клебсиеллами, их полисахариды рассматривают для создания конъюгативной клебсиеллезной вакцины [12].

Несмотря на ключевую роль плазмидно-локализованных детерминант резистентности, серорезистентность и устойчивость к фагоцитозу определяются ядерным геномом, а сочетание приобретенных и серотип-специфичных (ядерно-геномных) свойств играет определяющую роль в итоговой степени вирулентности [22, 48].

Плазмиды, несущие детерминанты и маркеры гипервирулентности, и пути формирования гибридного патотипа (конвергенции)

Подобно генам приобретенной резистентности, ключевые детерминанты гипервирулентности [38] имеют плазмидную локализацию и на сегодняшний день описанное разнообразие таких плазмид относительно ограничено. Наиболее типичными плазмидами, несущими детерминанты гипервирулентности, считаются *pLVPK* [8] и *pVIR-CR-HvKp4* [15, 37]. Ключевую роль играет кластер *iucABCD*, *iutA*, кодирующий аэробактин. Выявление этих генов в качестве маркеров с точностью 97% связано с гипервирулентностью. Кластер *iroBCDN*, кодирующий сидерофор сальмохелин, ассоциирован с гипервирулентностью, так же как и гены аэробактина, на 97% [38]. Кроме того, в качестве маркеров вирулентности предложены гены *peg-344* (транспортер) и *peg-589*, которые, соответственно, на 94 и 97% связаны с гипервирулентностью, и гены *rmpA* и *rmpA2* — «регуляторы мукоидного фенотипа» ассоциированы с гипервирулентными свойствами на 95 и 96% соответственно. Таким образом, гипервирулентные свойства определяются несколькими кластерами генов, локализованными на плазмидах гипервирулентности.

Распространение гипервирулентных штаммов, в первую очередь в азиатском регионе, связано с консервативными плазмидами «группы» *pLVPK*. Консервативность как самих первоначально обнаруженных плазмид вирулентности (типа *pLVPK* и *pK2044*), так и генетических линий с ними связанных (преимущественно CG23), вероятно, определяется отсутствием у данных плазмид кластера генов, отвечающих за конъюгацию. Драйвером распространения неконъюгативных плазмид с детерминантами гипервирулентности является клональное распространение, а не горизонтальный перенос генов. Тем не менее после достаточно долгого периода циркуляции плазмид с маркерами гипервирулентности (описываются начиная с 1986 г.) у клебсиелл некоторых генетических линий произошли события мобилизации детерминант гипервирулентности и, как следствие, включение в горизонтальный перенос генов в популяции (описанные случаи в 2016 г.), что привело к резкому расширению числа генетических линий и вариантов генетических платформ, несущих гены гипервирулентности. Также следствием мобилизации детерминант гипервирулентности является и расширение их ареала. Связь не совсем очевидна, но на примере важных генов антибио-

тикорезистентности можно проследить, что распространение мобильных генетических элементов за счет увеличения числа генетических линий клеток-хозяев, а иногда и числа видов, несущих данные детерминанты, приводит к более быстрому географическому распространению.

Первый путь формирования клебсиелл гибридного патотипа — это приобретение гипервирулентными клебсиеллами «условно типичными» для азиатского региона плазмид с генами, определяющими множественную резистентность. Данный путь — самый очевидный. Можно также предположить, что приобретение плазмиды с генами множественной резистентности скорее всего происходит во внутрибольничной среде, где внебольничный изолят вместе с пациентом попадает в стационар и происходит конъюгативный перенос плазмиды с генами резистентности от классической внутрибольничной клебсиеллы к внебольничной гипервирулентной и, как результат, формирование клебсиеллы гибридного патотипа с двумя плазмидами.

Первый тщательно изученный случай внутрибольничной вспышки, вызванной *K. pneumoniae*, демонстрирующий одновременно свойства множественной резистентности и гипервирулентности, и описанный в Китае в 2016 г. [15], был связан именно с двумя отдельными плазмидами. Изоляты *K. pneumoniae*, вызвавшие в 2016 г. вспышку летальной инфекции, относились к ST11 — самому распространенному карбапенем-резистентному сиквенс-типу в Китае, с которым связано более 60% всех случаев выявления клебсиелл, проявляющих резистентность к карбапенемам [58]. Пять пациентов были госпитализированы в ОРИТ, где у них развилась вентилятор-ассоциированная пневмония, вызванная карбапенем-резистентными *K. pneumoniae*. Все пять пациентов умерли в результате пневмонии, септического шока и полиорганной недостаточности. Продолжительность заболевания была от десяти дней до четырех месяцев.

Сравнение уровня вирулентности выделенных при вспышке изолятов с типичными для данного региона карбапенем-резистентными клебсиеллами ST11 в эксперименте на личинках *Galleria mellonella* показало, что при инфицировании классическими клебсиеллами ST11 через 48 ч после инъекции выжили 80% личинок, а после инфицирования изолятами того же ST11, выделенными от пяти умерших пациентов — уже через 24 ч погибли 100% личинок. Анализ данных полногеномного секвенирования выявил плазмиду *pLVPK*, с локализованными на ней генами вирулентности *iroBCDN*, *iucABCdiutA*, *rmpA*, *rmpA2* и *irp1*, *irp2*, и все пять изолятов имели конъюгативные плазмиды

с генами резистентности к карбапенемам и цефалоспорином — *bla*_{КРС-2}, *bla*_{СТХ-М-65} и *bla*_{ТЕМ-1}. Ретроспективный скрининг почти четырехсот карбапенем-резистентных изолятов, относящихся к ST11, проведенный в том же исследовании, выявил 11 изолятов (3%), несущих гены вирулентности, из которых у двух, вероятно, присутствовала плаزمид, аналогичная рLVPK, при этом все 11 изолятов также несли дополнительные плазмиды с генами карбапенемазы *bla*_{КРС-2}.

Аналогичные случаи выявлялись в различных регионах мира, где представители относительно консервативной генетической линии с плазмидами, близкими к рLVPK, приобретали конъюгативные плазмиды, характерные для конкретного региона, и в итоге изоляты демонстрировали гибридный патотип. В Китае подобных случаев описано больше всего [49], в частности с генами *bla*_{NDM}-типа, *bla*_{ОХА-48}-типа, и также описан вариант с карбапенемазой *bla*_{VIM}-типа [11] и копродукцией карбапенемазы *bla*_{NDM-1} и *bla*_{КРС-2} [26]. В Японии клебсиелла ST11 с рLVPK-подобной плазмидой приобрела вторую плазмиду с распространенной в этой стране карбапенемазой IMP-типа [17].

Второй гипотетический путь формирования клебсиелл гибридного патотипа — интеграция генов резистентности в плазмиду типа рLVPK. Данный вариант можно считать тупиковым, так как без интеграции кластера генов, который бы мог обеспечить конъюгативный перенос, такое генетическое событие эволюционно мало перспективно, либо промежуточно (с точки зрения мобилизации детерминант гипервирулентности). Интеграция мобильных элементов, таких как транспозоны, инсерционные последовательности (IS-элементы) и интегроны, способна увеличить вероятность дальнейшей рекомбинации плазмид.

Третий вариант — наиболее интересный и потенциально наиболее значительный в контексте распространения клебсиелл гибридного патотипа — формирование конъюгативных плазмид, несущих одновременно маркеры и гипервирулентности, и множественной резистентности. Так как «исходные» плазмиды, которые сейчас известны, неконъюгативны, можно предположить, что сначала произошли события, описанные выше, а затем в результате рекомбинации сформировались мозаичные плазмиды, способные к конъюгативному переносу. С момента формирования таких генетических платформ гибридный патотип могут приобретать клебсиеллы различных генетических линий и исчезает связь с исходным «азиатским» клональным комплексом CG23. На сегодняшний момент гибридные плазмиды описаны, помимо Китая, в Англии [51], Чехии

(публикации нет, только последовательность в базе GenBank) и России [23, 45].

В Англии описаны гибридные плазмиды, относящиеся к внутрибольничным генетическим линиям ST15, ST48, ST101, ST147 и ST383. Важно отметить, что описанные изоляты были выделены в различных городах, а также у них обнаруживалась мозаичность плазмид, выражающаяся в различных сочетаниях генов гипервирулентности и резистентности на различных плазмидах отдельных штаммов. Так, гены карбапенемазы могут быть как на одной плазмиде с генами гипервирулентности, так и сосуществовать на разных плазмидах, так же как и гены гипервирулентности могут присутствовать как на одной, так и на разных плазмидах одного изолята. В качестве примера можно привести гены, локализованные на плазмиде рKpVST383L (GB: CP034201) длиной 372826 п.о. Из генов вирулентности на ней локализованы: *iutA* (рецептор аэробактина), *iucABCD* (кластер аэробактина), *rmpA/rmpA2* (регуляторы мукоидного фенотипа), *terABCDEFGHIJKL* (гены устойчивости к теллуриду), *cobW* (синтез кобаламина), *luxR* (регулятор экспрессии генов вирулентности), *pagO* (защита от фагоцитоза), *shiF* (вероятно, участвует в транспорте лизина). Также на ней локализованы следующие гены резистентности: *bla*_{NDM-5}, *bla*_{СТХМ-15}, *bla*_{ОХА-9}, *qnrS1*, *bla*_{ТЕМ-1B}, *dfrA5*, *catA1*, *sul1*, *sul2*, *armA*, *aph(30)-Ia*, *aph(30)-VI*, *aac(60)-Ib*, *aadA1*, *aac(60)-Ib-cr*, *mph(A)*, *mph(E)* и *msr(E)*. Появление гибридных плазмид среди генетических линий, относящихся к типичным внутрибольничным группам, расширяет генетическое разнообразие представителей гибридного патотипа.

Распространение hv-MDR-Kpн в мире и в России

Несмотря на относительно скромное число описанных случаев hv-MDR-Kpн даже в Китае, основываясь на опыте с появлением и распространением карбапенемазы и генов тсг-типа, есть высокая вероятность, что в ближайшее время последует значительное число публикаций, отражающих актуальную ситуацию в мире и России, в частности.

Первые случаи в России hv-MDR-Kpн описаны в 2018 г. в Москве на основе анализа коллекции клебсиелл, собранных в 2012–2016 гг. Были обнаружены девятнадцать изолятов, демонстрирующих уровень вирулентности на мышях LD₅₀ ≤ 10⁴. Выявленные гипервирулентные штаммы относились к азиатской клональной группе ST23, несли плазмиду, близкую к типовой гипервирулентной плазмиде рLVPK [8], а также две дополнительные плазмиды, несущие гены приобретенной резистентности, в том

числе карбапенемазу ОХА-48 [24]. Всего авторы выявили 22 изолята, демонстрирующих гипермукоидный фенотип, из которых наиболее вирулентные относились к К1, К2 и К54 капсульным серотипам [24]. Также в 2020 г. описана клебсиелла ST23, несущая набор генов гипервирулентности вместе с карбапенемазой ОХА-48, выделенная в 2017 г. из крови пациента в отделении гематологии [43]. В 2020 г. описан еще один случай гипервирулентной клебсиеллы, ST23-К1, продуцирующей карбапенемазу ОХА-48-типа, выделенной от пациента отделения реанимации в 2014 г. [41]. Анализ плазмид показал, что аэробактиновый кластер локализован на плазмиде, типичной для гипервирулентных клебсиелл ST23, а гены резистентности (*bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{ОХА-48}) локализованы на двух разных, также распространенных, плаزمидах [41]. Таким образом, описанные случаи hv-MDR-Kpn связаны с распространением гипервирулентных клебсиелл, относящихся к ST23-К1, имеющих эпидемиологическую связь с Китаем и сумевших приобрести дополнительные плазмиды с генами резистентности. Возможно, данные изоляты приобретают детерминанты резистентности, попадая уже во внутрибольничную среду в России.

Принципиально иная ситуация описана в Санкт-Петербурге [23]. Описаны изоляты, относящиеся к внутрибольничным генетическим линиям ST147-K2, ST395-K20, демонстрирующие различные комбинации генов приобретенной резистентности и генов гипервирулентности, среди которых 13 из 15 являются продуцентами карбапенемаз NDM-типа. Различный набор генов, как резистентности, так и вирулентности, коррелировал с фенотипом и уровнем вирулентности в септической модели на мышах. Изоляты, где плазмидно-локализованные сидерофоры представлены только аэробактером, демонстрировали меньшую летальность (10^4 КОЕ), чем те, где представлены и аэробактерин, и иерсиниобактерин (10^2 КОЕ). Описанные случаи внутрибольничных hv-MDR-Kpn по набору приобретенных генов очень близки к описанным в Англии случаям [50]. Можно сделать

вывод, что на сегодняшний день в России описаны два пути формирования hv-MDR-Kpn: приобретение классическими гипервирулентными генетическими линиями, имеющими эпидемиологическую связь с Тихоокеанским регионом плазмид с генами резистентности (в Москве, например), а также приобретение типичными внутрибольничными генетическими линиями, для которых характерна множественная резистентность, плазмид, несущих гены гипервирулентности.

Заключение

За прошедшие десять лет после описания в России первых клебсиелл, продуцирующих карбапенемазы, мы наблюдали распространение устойчивости к карбапенемам. Распространение нескольких различных типов карбапенемаз демонстрирует, что изменение свойств микробного сообщества, в частности внутрибольничного, является системной реакцией на введение в практику новых препаратов. Появление в России hv-MDR-Kpn также связано с разнообразием генетических линий и путями формирования комбинированного патотипа, что указывает на глобальную тенденцию и возможную системность изменения свойств микробного сообщества. В случае повторения пессимистичного сценария, который наблюдался последние десять лет в связи с распространением карбапенемаз, эффективности здравоохранения будет нанесен более чем существенный вред.

Важно отметить, что в Китае после описанного случая были введены меры, направленные на предотвращение внутрибольничных вспышек гипервирулентных карбапенем-резистентных штаммов. Самые значимые из них: скрининг на ректальное носительство перед госпитализацией, изоляция пациентов, меры по дезинфекции медицинского персонала, контактирующего с носителями, двухнедельный период дезинфекции боксов, в которых находились пациенты с гипервирулентными множественно резистентными клебсиеллами.

Список литературы/References

1. Amako K., Meno Y., Takade A. Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. *J. Bacteriol.*, 1988, vol. 170, no. 10, pp. 4960–4962. doi: 10.1128/jb.170.10.4960-4962.1988
2. Arato V., Raso M.M., Gasperini G., Berlanda Scorza F., Micoli F. Prophylaxis and treatment against *Klebsiella pneumoniae*: current insights on this emerging anti-microbial resistant global threat. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, no. 8. doi: 10.3390/ijms22084042
3. Bensley E.H. A case of Friedlander's pneumonia. *Can. Med. Assoc. J.*, 1932, vol. 26, no. 6, pp. 681–684.
4. Bernhard W., Gbarah A., Sharon N. Lectinophagocytosis of type 1 fimbriated (mannose-specific) *Escherichia coli* in the mouse peritoneum. *J. Leukoc. Biol.*, 1992, vol. 52, no. 3, pp. 343–348. doi: 10.1002/jlb.52.3.343
5. Bialek-Davenet S., Criscuolo A., Ailloud F., Passet V., Jones L., Delannoy-Vieillard A.S., Garin B., Le Hello S., Arlet G., Nicolas-Chanoine M.H., Decre D., Brisse S. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, vol. 20, no. 11, pp. 1812–1820. doi: 10.3201/eid2011.140206

6. Brisse S., Fevre C., Passet V., Issenhuth-Jeanjean S., Tournebize R., Diancourt L., Grimont P. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 3: e4982. doi: 10.1371/journal.pone.0004982
7. Brown J.S., Holden D.W. Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes Infect.*, 2002, vol. 4, no. 11, pp. 1149–1156. doi: 10.1016/s1286-4579(02)01640-4
8. Chen Y.T., Chang H.Y., Lai Y.C., Pan C.C., Tsai S.F., Peng H.L. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene*, 2004, vol. 337, pp. 189–198. doi: 10.1016/j.gene.2004.05.008
9. Clarke B.R., Ovchinnikova O.G., Kelly S.D., Williamson M.L., Butler J.E., Liu B., Wang L., Gou X., Follador R., Lowary T.L., Whitfield C. Molecular basis for the structural diversity in serogroup O2-antigen polysaccharides in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.*, 2018, vol. 293, no. 13, pp. 4666–4679. doi: 10.1074/jbc.RA117.000646
10. Di Martino P., Livrelli V., Sirot D., Joly B., Darfeuille-Michaud A. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, no. 6, pp. 2266–2273. doi: 10.1128/iai.64.6.2266-2273.1996
11. Dong N., Sun Q., Huang Y., Shu L., Ye L., Zhang R., Chen S. Evolution of carbapenem-resistant serotype K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* by acquisition of bla VIM-1-bearing plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2019, vol. 63, no. 9. doi: 10.1128/AAC.01056-19
12. Feldman M.F., Mayer Bridwell A.E., Scott N.E., Vinogradov E., McKee S.R., Chavez S.M., Twentyman J., Stallings C.L., Rosen D.A., Harding C.M. A promising bioconjugate vaccine against hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2019, vol. 116, no. 37, pp. 18655–18663. doi: 10.1073/pnas.1907833116
13. Follador R., Heinz E., Wyres K.L., Ellington M.J., Kowarik M., Holt K.E., Thomson N.R. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb. Genom.*, 2016, vol. 2, no. 8: e000073. doi: 10.1099/mgen.0.000073
14. Fung C.P., Chang F.Y., Lee S.C., Hu B.S., Kuo B.I., Liu C.Y., Ho M., Siu L.K. A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis? *Gut*, 2002, vol. 50, no. 3, pp. 420–424. doi: 10.1136/gut.50.3.420
15. Gu D., Dong N., Zheng Z., Lin D., Huang M., Wang L., Chan E.W., Shu L., Yu J., Zhang R., Chen S. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.*, 2018, vol. 18, no. 1, pp. 37–46. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30489-9
16. Guo C., Yang X., Wu Y., Yang H., Han Y., Yang R., Hu L., Cui Y., Zhou D. MLST-based inference of genetic diversity and population structure of clinical *Klebsiella pneumoniae*, China. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5: 7612. doi: 10.1038/srep07612
17. Harada S., Aoki K., Ishii Y., Ohno Y., Nakamura A., Komatsu M., Tateda K. Emergence of IMP-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* carrying a pLVPK-like virulence plasmid. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2019, vol. 53, no. 6, pp. 873–875. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.05.007
18. Holmes R.B. Friedländer's pneumonia. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.*, 1956, vol. 75, no. 4, pp. 728–745.
19. Holt K.E., Wertheim H., Zadoks R.N., Baker S., Whitehouse C.A., Dance D., Jenney A., Connor T.R., Hsu L.Y., Severin J., Brisse S., Cao H., Wilksch J., Gorrie C., Schultz M.B., Edwards D.J., Nguyen K.V., Nguyen T.V., Dao T.T., Mensink M., Minh V.L., Nhu N.T., Schultsz C., Kuntaman K., Newton P.N., Moore C.E., Strugnell R.A., Thomson N.R. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2015, vol. 112, no. 27: E3574–81. doi: 10.1073/pnas.1501049112
20. Lam M.M.C., Wyres K.L., Duchene S., Wick R.R., Judd L.M., Gan Y.H., Hoh C.H., Archuleta S., Molton J.S., Kalimuddin S., Koh T.H., Passet V., Brisse S., Holt K.E. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. *Nat. Commun.*, 2018, vol. 9, no. 1: 2703. doi: 10.1038/s41467-018-05114-7
21. Lampe W.T. *Klebsiella pneumoniae*. A review of forty-five and re-evaluation of the incidence and antibiotic sensitivities. *Dis. Chest.*, 1964, vol. 46, pp. 599–606. doi: 10.1378/chest.46.5.599
22. Lan P., Jiang Y., Zhou J., Yu Y. A global perspective on the convergence of hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 2021, vol. 25, pp. 26–34. doi: 10.1016/j.jgar.2021.02.020
23. Lazareva I., Ageevets V., Sopova J., Lebedeva M., Starkova P., Likholetova D., Gostev V., Moiseenko V., Egorenkov V., Navatskaya A., Mitroshina G., Myasnikova E., Tsvetkova I., Lobzin Y., Sidorenco S. The emergence of hypervirulent bla_{NDM-1}-positive *Klebsiella pneumoniae* sequence type 395 in an oncology hospital. *Infect. Genet. Evol.*, 2020, vol. 85: 104527. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104527
24. Lev A.I., Astashkin E.I., Kislichkina A.A., Solovieva E.V., Kombarova T.I., Korobova O.V., Ershova O.N., Alexandrova I.A., Malikov V.E., Bogun A.G., Borzilov A.I., Volozhantsev N.V., Svetoch E.A., Fursova N.K. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. *Pathog. Glob. Health.*, 2018, vol. 112, no. 3, pp. 142–151. doi: 10.1080/20477724.2018.1460949
25. Liao C.H., Huang Y.T., Chang C.Y., Hsu H.S., Hsueh P.R. Capsular serotypes and multilocus sequence types of bacteremic *Klebsiella pneumoniae* isolates associated with different types of infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2014, vol. 33, no. 3, pp. 365–369. doi: 10.1007/s10096-013-1964-z
26. Liu Y., Long D., Xiang T.X., Du F.L., Wei D.D., Wan L.G., Deng Q., Cao X.W., Zhang W. Whole genome assembly and functional portrait of hypervirulent extensively drug-resistant NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* of capsular serotype K2 and ST86. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2019, vol. 74, no. 5, pp. 1233–1240. doi: 10.1093/jac/dkz023
27. Liu Y.C., Cheng D.L., Lin C.L. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Arch. Intern. Med.*, 1986, vol. 146, no. 10, pp. 1913–1916.
28. Luo Y., Wang Y., Ye L., Yang J. Molecular epidemiology and virulence factors of pyogenic liver abscess causing *Klebsiella pneumoniae* in China. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2014, vol. 20, no. 11: O818–24. doi: 10.1111/1469-0691.12664
29. Moradali M.F., Rehm B.H.A. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2020, vol. 18, no. 4, pp. 195–210. doi: 10.1038/s41579-019-0313-3

30. Nassif X., Fournier J.M., Arondel J., Sansonetti P.J. Mucoïd phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect. Immun.*, 1989, vol. 57, no. 2, pp. 546–552. doi: 10.1128/iai.57.2.546-552.1989
31. Nassif X., Honoré N., Vasselon T., Cole S.T., Sansonetti P.J. Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 1989, vol. 3, no. 10, pp. 1349–1359. doi: 10.1111/j.1365-2958.1989.tb00116.x
32. Nassif X., Sansonetti P.J. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect. Immun.*, 1986, vol. 54, no. 3, pp. 603–608. doi: 10.1128/iai.54.3.603-608.1986
33. Oseasohn R. Friedlander's pneumonia. *Med. Sci.*, 1962, vol. 11, pp. 1000–1008.
34. Pan Y.J., Lin T.L., Chen C.T., Chen Y.Y., Hsieh P.F., Hsu C.R., Wu M.C., Wang J.T. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5: 15573. doi: 10.1038/srep15573
35. Posey J.E., Gherardini F.C. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science*, 2000, vol. 288, no. 5471, pp. 1651–1653. doi: 10.1126/science.288.5471.1651
36. Russo T.A., MacDonald U. The *Galleria mellonella* infection model does not accurately differentiate between hypervirulent and classical *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere*, 2020, vol. 5, no. 1: e00850-19. doi: 10.1128/mSphere.00850-19
37. Russo T.A., Marr C.M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2019, vol. 32, no. 3: e00001-19. doi: 10.1128/CMR.00001-19
38. Russo T.A., Olson R., Fang C.T., Stoesser N., Miller M., MacDonald U., Hutson A., Barker J.H., La Hoz R.M., Johnson J.R. Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical K. pneumoniae. *J. Clin. Microbiol.*, 2018, vol. 56, no. 9. doi: 10.1128/JCM.00776-18
39. Russo T.A., Olson R., Macdonald U., Metzger D., Maltese L.M., Drake E.J., Gulick A.M. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 2014, vol. 82, no. 6, pp. 2356–2367. doi: 10.1128/IAI.01667-13
40. Sebghati T.A., Korhonen T.K., Hornick D.B., Clegg S. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infect. Immun.*, 1998, vol. 66, no. 6, pp. 2887–2894. doi: 10.1128/IAI.66.6.2887-2894.1998
41. Shaidullina E., Shelenvov A., Yanushevich Y., Mikhaylova Y., Shagin D., Alexandrova I., Ershova O., Akimkin V., Kozlov R., Edelstein M. Antimicrobial resistance and genomic characterization of OXA-48- and CTX-M-15-co-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 recovered from nosocomial outbreak. *Antibiotics (Basel)*, 2020, vol. 9, no. 12. doi: 10.3390/antibiotics9120862
42. Sharon N. Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. *FEBS Lett.*, 1987, vol. 217, no. 2, pp. 145–157. doi: 10.1016/0014-5793(87)80654-3
43. Shelenvov A., Mikhaylova Y., Yanushevich Y., Samoilov A., Petrova L., Fomina V., Gusarov V., Zamyatin M., Shagin D., Akimkin V. Molecular typing, characterization of antimicrobial resistance, virulence profiling and analysis of whole-genome sequence of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antibiotics (Basel)*, 2020, vol. 9, no. 5. doi: 10.3390/antibiotics9050261
44. Shon A.S., Bajwa R.P., Russo T.A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*, 2013, vol. 4, no. 2, pp. 107–118. doi: 10.4161/viru.22718
45. Starkova P., Lazareva I., Avdeeva A., Sulian O., Likholetova D., Ageevets V., Lebedeva M., Gostev V., Sopova J., Sidorenko S. Emergence of hybrid resistance and virulence plasmids harboring new delhi metallo-beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Russia. *Antibiotics (Basel)*, 2021, vol. 10, no. 6. doi: 10.3390/antibiotics10060691
46. Struve C., Bojer M., Krogfelt K.A. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect. Immun.*, 2008, vol. 76, no. 9, pp. 4055–4065. doi: 10.1128/IAI.00494-08
47. Struve C., Roe C.C., Stegger M., Stahlhut S.G., Hansen D.S., Engelthaler D.M., Andersen P.S., Driebe E.M., Keim P., Krogfelt K.A. Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *mBio*, 2015, vol. 6, no. 4: e00630. doi: 10.1128/mBio.00630-15
48. Tang H.L., Chiang M.K., Liou W.J., Chen Y.T., Peng H.L., Chiou C.S., Liu K.S., Lu M.C., Tung K.C., Lai Y.C. Correlation between *Klebsiella pneumoniae* carrying pLVPK-derived loci and abscess formation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2010, vol. 29, no. 6, pp. 689–698. doi: 10.1007/s10096-010-0915-1
49. Tang M., Kong X., Hao J., Liu J. Epidemiological characteristics and formation mechanisms of multidrug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.*, 2020, vol. 11: 581543. doi: 10.3389/fmicb.2020.581543
50. Turton J., Davies F., Perry C., Payne Z., Pike R. Hybrid resistance and virulence plasmids in “high-risk” clones of *Klebsiella pneumoniae*, including those carrying bla_{NDM-5}. *Microorganisms*, 2019, vol. 7, no. 9. doi: 10.3390/microorganisms7090326
51. Turton J.F., Payne Z., Coward A., Hopkins K.L., Turton J.A., Doumith M., Woodford N. Virulence genes in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from the UK during 2016, including among carbapenemase gene-positive hypervirulent K1-ST23 and “non-hypervirulent” types ST147, ST15 and ST383. *J. Med. Microbiol.*, 2018, vol. 67, no. 1, pp. 118–128. doi: 10.1099/jmm.0.000653
52. Walker K.A., Miller V.L. The intersection of capsule gene expression, hypermucoviscosity and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2020, vol. 54, pp. 95–102. doi: 10.1016/j.mib.2020.01.006
53. Wu C.C., Huang Y.J., Fung C.P., Peng H.L. Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc fimbriae by the site-specific recombinase KpcI. *Microbiology (Reading)*, 2010, vol. 156, pt. 7, pp. 1983–1992. doi: 10.1099/mic.0.038158-0
54. Wu H., Li D., Zhou H., Sun Y., Guo L., Shen D. Bacteremia and other body site infection caused by hypervirulent and classic *Klebsiella pneumoniae*. *Microb. Pathog.*, 2017, vol. 104, pp. 254–262. doi: 10.1016/j.micpath.2017.01.049
55. Wyres K.L., Wick R.R., Gorrie C., Jenney A., Follador R., Thomson N.R., Holt K.E. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microbial Genomics*, 2016, vol. 2, no. 12. doi: 10.1099/mgen.0.000102
56. Yeh K.M., Kurup A., Siu L.K., Koh Y.L., Fung C.P., Lin J.C., Chen T.L., Chang F.Y., Koh T.H. Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, vol. 45, no. 2, pp. 466–471. doi: 10.1128/JCM.01150-06

57. Yu W.L., Ko W.C., Cheng K.C., Lee C.C., Lai C.C., Chuang Y.C. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2008, vol. 62, no. 1, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.007
58. Zhang R., Liu L., Zhou H., Chan E.W., Li J., Fang Y., Li Y., Liao K., Chen S. Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) strains in China. *eBioMedicine*, 2017, vol. 19, pp. 98–106. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.04.032

Авторы:

Агеевец В.А., к.б.н., научный сотрудник научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Агеевец И.В., к.м.н., научный сотрудник научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Сидоренко С.В., д.м.н., профессор, зав. научно-исследовательским отделом медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Ageevets V.A., PhD (Biology), Researcher, Research Department of Medical Microbiology and Molecular Epidemiology, Paediatric Research and Clinical Centre for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation;

Ageevets I.V., PhD (Medicine), Researcher, Research Department of Medical Microbiology and Molecular Epidemiology, Paediatric Research and Clinical Centre for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation;

Sidorenko S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Research Department of Medical Microbiology and Molecular Epidemiology, Paediatric Research and Clinical Centre for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.11.2021
Принята к печати 29.03.2022

Received 17.11.2021
Accepted 29.03.2022

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ ВЭБ-1/ВЭБ-2 И ВГЧ-6А/ВГЧ-6В В СЛЮНЕ

М.И. Попкова¹, О.В. Уткин¹, Д.А. Брызгалова¹, А.О. Сенатская¹, Е.А. Соболева²,
Н.А. Сахарнов¹, Е.Н. Филатова¹, Е.А. Кулова³

¹ ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

² ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

³ ООО «Тонус Кроха и семейная стоматология», Нижний Новгород, Россия

Резюме. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) и вирусы герпеса человека 6А и 6В (ВГЧ-6А и ВГЧ-6В) убиквитарны, инфицируют все социальные группы. В России сведения о генетической неоднородности ВЭБ, даже на уровне основных типов (ВЭБ-1 и ВЭБ-2), а также ВГЧ-6А и ВГЧ-6В, их распространенности и клиническом значении ограничиваются единичными публикациями. Преимущественно исследовались плазма и лейкоциты крови. Слюна — основной фактор передачи и распространения ВЭБ- и ВГЧ-6А/В-инфекции, доступный, недорогой, неинвазивный материал для обнаружения вирусной ДНК. Цель данной работы — совершенствование методической базы для дифференциальной детекции ВГЧ-6А/ВГЧ-6В и основных типов ВЭБ в слюне. Материалом исследования послужила нестимулированная смешанная слюна детей в возрасте 1–17 лет с острым инфекционным мононуклеозом ($n = 22$) и с отсутствием клинических симптомов данного заболевания ($n = 26$), а также условно здоровых взрослых ($n = 9$). Образцы собирали однократно и в динамике (ежедневно в течение 14 дней). Количественное определение ДНК ВЭБ и ВГЧ-6А/В выполнено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Для дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2 и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В в работе применялся оптимизированный однораундовый вариант ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. В результате частота выявления ДНК ВЭБ, ВГЧ-6А/В и ВЭБ+ВГЧ-6А/В при остром инфекционном мононуклеозе составила 95, 91 и 86%, среди условно здоровых детей — 69, 85 и 61,5% соответственно. Установлено, что у детей Нижегородского региона в слюне преобладают исключительно ВЭБ-1 и ВГЧ-6В. По результатам 14-дневного динамического мониторинга выделения вирусов со слюной у здоровых вирусоносителей (взрослых и детей) показано, что однократное исследование ДНК ВЭБ не позволяет достоверно оценить инфицированность лиц или интенсивность выделения ВЭБ. При этом ВГЧ-6А/В характеризуется более постоянным и равномерным выделением. Оптимизированный в данной работе методический подход позволяет раздельно детектировать ВЭБ-1/ВЭБ-2 и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В по единому лабораторному протоколу, а в сочетании с дополнительным этапом пробоподготовки слюны 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: ВЭБ-1, ВЭБ-2, ВГЧ-6А, ВГЧ-6В, слюна, 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 Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (831) 469-79-46 (раб.), 8 906 352-60-15 (моб.).
Факс: 8 (831) 469-79-20.
E-mail: popmarig@mail.ru

Contacts:

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

Для цитирования:

Попкова М.И., Уткин О.В., Брызгалова Д.А., Сенатская А.О.,
Соболева Е.А., Сахарнов Н.А., Филатова Е.Н., Кулова Е.А.
Методические подходы к дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2
и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В в слюне // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3.
С. 461–474. doi: 10.15789/2220-7619-MAT-1807

Citation:

Popkova M.I., Utkin O.V., Bryzgalova D.A., Senatskaia A.O., Soboleva E.A.,
Sakharnov N.A., Filatova E.N., Kulova E.A. Methodological approaches
to differential detection of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B in saliva // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12,
no. 3, pp. 461–474. doi: 10.15789/2220-7619-MAT-1807

METHODOLOGICAL APPROACHES TO DIFFERENTIAL DETECTION OF EBV1/EBV2 AND HHV6A/HHV6B IN SALIVA

Popkova M.I.^a, Utkin O.V.^a, Bryzgalova D.A.^a, Senatskaia A.O.^a, Soboleva E.A.^b, Sakharnov N.A.^a, Filatova E.N.^a, Kulova E.A.^c

^aAcademician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

^bPrivolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

^cTonus Krokha and Family Dentistry Clinic LLC, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

Abstract. Epstein–Barr virus (EBV) and human herpesviruses 6A and 6B (HHV6A and HHV6B) are ubiquitous, infecting representatives of all social groups, starting from early childhood. Currently, information on the genetic heterogeneity of EBV, even at the level of the main types (EBV1 and EBV2), as well as HHV6A and HHV6B, their prevalence and clinical significance are limited mainly by foreign data. In Russia, there are not so many publications devoted to this issue. In this case, the objects of study are mainly plasma and leukocytes of peripheral blood, scrapings or swabs from the oropharynx are used much less often. Saliva is the main factor in the transmission and spread of EBV and HHV6A/B infections. Saliva testing is an affordable, inexpensive, and non-invasive method for detecting viral DNA. The purpose of this work is to improve the methodological base for differential detection of HHV6A/HHV6B and the main types of EBV in saliva. The material for the study was unstimulated mixed saliva of children aged 1–17 years with acute infectious mononucleosis (n = 22) and no clinical symptoms of this disease (n = 26), as well as conditionally healthy adults (n = 9). Samples were collected once and dynamically (daily for 14 days). The detection and quantification of EBV DNA and HHV6A/B DNA was performed using real-time PCR. For the differential determination of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B, an optimized one-round PCR variant with electrophoretic detection of amplification products in an agarose gel was used. Statistical data processing was carried out using the R programming language and the RStudio environment. According to the results of our own research, the frequency of detection of EBV, HHV6A/B and EBV+HHV6A/B DNA in acute infectious mononucleosis was 95, 91 and 86%, and among conventionally healthy children — 69, 85 and 61.5%, respectively. It was found that among the examined children of the Nizhny Novgorod Region, EBV1 and HHV6B prevail in the viral population, which is consistent with existing ideas about their geographical distribution in the adjacent territories. EBV2 and HHV6A were not detected in any of the examined saliva samples. According to the results of 14-day dynamic monitoring of saliva virus secretion in healthy virus carriers (adults and children), it was shown that a single EBV DNA study does not allow to reliably assess the infection of individuals or the intensity of EBV secretion. In this case, HHV6A/B is characterized by a more constant and uniform release. The methodological approach optimized in this work makes it possible to separately detect EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B according to a single laboratory protocol, and in combination with an additional stage of saliva sample preparation increases the diagnostic sensitivity of PCR analysis, minimizes the 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, saliva, PCR, genotyping, differential detection.

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) и вирусы герпеса человека 6А и 6В (ВГЧ-6А и ВГЧ-6В) ubiquitous, инфицируют представителей всех социальных групп, начиная с раннего детского возраста. Они характеризуются выраженной лимфотропностью, способностью к хромосомной интеграции генома, модуляции иммунного ответа организма хозяина, онкогенным потенциалом. ВЭБ общеизвестен как самый частый возбудитель инфекционного мононуклеоза (ИМ) (76,6% случаев) [4], ВГЧ-6В является этиологическим агентом внезапной экзантемы, реже ИМ, в то время как специфическая форма ВГЧ-6А-инфекции еще не определена [10]. Спектр ВЭБ- и ВГЧ-6А/В-ассоциированных заболеваний у детей и взрослых постоянно расширяется и уточняется. Специфические средства их лечения и профилактики до настоящего времени не разработаны.

ВЭБ характеризуется генетической гетерогенностью. Первой и общепринятой классификацией генетического разнообразия ВЭБ является деление на два основных типа — ВЭБ-1 и ВЭБ-2 [20]. Патогенетическая роль каждого из них до конца не изучена, доказательств о связи генотипов с развитием различных заболеваний недостаточно. ВГЧ-6А и ВГЧ-6В были официально ратифицированы в 2012 г. Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) как два разных вида, заменив ВГЧ-6 [13]. Обобщающее название «ВГЧ-6» или «ВГЧ-6А/В» встречается в исследованиях, не предусматривающих видовую дифференциацию [21]. Эксперты призывают ученых и врачей четко различать ВГЧ-6А и ВГЧ-6В для их клинической и эпидемиологической стратификации [13].

Существующие серологические методы не позволяют отдельно определять ВГЧ-6А, ВГЧ-6В и основные типы ВЭБ. Для их диффе-

ренциальной детекции применяют методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), при этом основная часть исследований реализована с помощью «гнездовой» ПЦР [12, 42]. Зарегистрированных тест-систем для типирования ВЭБ-1/ВЭБ-2 и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В в России нет, что ограничивает возможности их применения в клинической практике.

В публикациях отечественных авторов дифференциальная детекция ВГЧ-6А/ВГЧ-6В и основных типов ВЭБ носит эпизодический и противоречивый характер [6, 8, 12]. Объектами исследования преимущественно являются плазма и лейкоциты периферической крови, значительно реже используются соскобы или смывы из ротоглотки. В то же время в зарубежных публикациях показана принципиальная возможность исследования с этой целью слюны. При этом только единичные работы посвящены одновременной дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2 и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В [27].

Слюна — основной фактор передачи и распространения ВЭБ- и ВГЧ-6А/В-инфекции. Исследование слюны представляет собой доступный, недорогой и неинвазивный способ обнаружения вирусной ДНК [16, 31, 40]. Известно, что разные штаммы одного и того же вируса доминируют в разных биосубстратах (лейкоциты крови, плазма, слюна, опухолевые ткани), могут мигрировать между ними в ходе жизненного цикла или замещаться на новые в результате повторного инфицирования [28, 39, 40]. В целом характеристика генетических особенностей циркулирующих вирусов лежит в основе изучения патогенеза, целевой разработки методов лабораторной диагностики, вакцин, средств специфической терапии, а также совершенствования системы эпидемиологического надзора за инфекциями.

Целью данной работы явилось совершенствование методической базы для дифференциальной детекции ВГЧ-6А/ВГЧ-6В и основных типов ВЭБ в слюне.

Материалы и методы

Обследованию подлежали дети в возрасте 1–17 лет (медиана 6 [3; 10] лет), госпитализированные в ГБУЗ НО «Детская инфекционная больница № 8 г. Нижнего Новгорода» с клиническим диагнозом «Острый инфекционный мононуклеоз» (ОИМ) (n = 22). Группа сравнения сформирована из клинически здоровых детей сопоставимого пола и возраста (n = 26), проходивших диспансеризацию в ООО «Тонус Кроха и семейная стоматология» (г. Нижний Новгород). Взрослые условно здоровые доноры были привлечены для отработки методов и динамического наблюдения выделения вирусов со слюной (n = 9).

Материалом для исследования послужила нестимулированная смешанная слюна (далее — слюна). Образцы собирали однократно и в динамике. Однократный забор материала проводили: 1) у пациентов с ОИМ в первые 3–10 дней от начала клинических проявлений; 2) у здоровых волонтеров в день обследования. Для исследования динамики выделения ВЭБ и ВГЧ-6А/В со слюной у шести клинически здоровых вирусоносителей (5 взрослых 25–40 лет и 1 ребенок 3 лет) материал собирали ежедневно в течение 14 дней.

Информированное согласие родителей или опекунов на проведение исследовательской работы в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013) было получено лечащими врачами медицинских организаций.

Сбор материала. Сбор материала проводили утром после сна натошак до проведения гигиенических процедур полости рта. Применяли традиционную методику накопления слюны в ротовой полости и сплевывания ее в контейнер для сбора биоматериала. Использовали пластиковые одноразовые емкости с крышкой. Образцы слюны доставляли в лабораторию в течение 2 часов, аликвотировали в микропробирки объемом 1,5 мл по 100 мкл для реализации способа 1, 300 мкл для реализации способа 2, дополнительно по 500 и 1000 мкл для отработки способа 2. Пробы хранили при –80°С до момента исследования. Допускалось только однократное замораживание—оттаивание биоматериала.

Пробоподготовка. Способ 1. Предварительная обработка проб слюны не требуется [3].

Способ 2. Пробы цельной слюны в объеме 300 мкл предварительно обрабатывали путем центрифугирования при 13 000 об/мин в течение 5 мин. На этапе отработки метода на биоматериале взрослых здоровых волонтеров таким же образом обрабатывали пробы по 500 мкл и 1000 мкл. Полученную надосадочную жидкость удаляли (на этапе отработки метода ее использовали для ПЦР-анализа). К осадку добавляли до 100 мкл деионизированной воды I типа и тщательно ресуспендировали. Полученную суспензию осадка использовали для выделения нуклеиновых кислот.

Выделение ДНК. Экстракцию тотальной ДНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Способ 1. При работе с цельной слюной и надосадочной жидкостью точно следовали инструкции производителя. Для выделения вирусной ДНК использовали 100 мкл пробы.

Способ 2. Материалом для выделения нуклеиновых кислот послужили 100 мкл предварительно подготовленной суспензии осадка

слюны. В ходе выделения проводили дополнительный этап: смесь осадка слюны и лизирующего раствора после прогревания (65°C, 5 мин) центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 5 мин. Полученный супернатант полностью отбирали и переносили в чистую пробирку объемом 1,5 мл, сразу добавляли к нему раствор для преципитации, продолжая процедуру выделения согласно инструкции.

Концентрацию и чистоту выделенной тотальной ДНК измеряли с помощью спектрофотометра BioPhotometer Plus (Eppendorf, Германия).

Количественное определение ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ-6А/В. Выявление и количественное определение ДНК вирусов выполняли с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением коммерческих наборов «АмплиСенс® EBV-скрин/монитор-FL» и «АмплиСенс® HHV6-скрин-титр-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) на амплификаторе RotorGene Q 5plex HRM (Qiagen, Германия). Лабораторный протокол для ПЦР-РВ соблюдался согласно инструкции производителя. Результаты выражали в количественном формате — в количестве копий ДНК на мл образца цельной слюны, а при сравнительном анализе двух способов пробоподготовки — в копиях ДНК в пробе.

Дифференциальная детекция ВЭБ-1/ВЭБ-2 и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В. Для раздельной детекции основных типов ВЭБ (ВЭБ-1 и ВЭБ-2) применен модифицированный нами вариант описанной ранее двухраундовой «гнездовой» ПЦР [42]. ПЦР проводили в один раунд в разных пробирках с использованием специфических пар праймеров, ранее использовавшихся для второго раунда: 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. (англоязычная аббревиатура — bp), и 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 ВЭБ-1 и ВЭБ-2 соответственно [42].

Для раздельной детекции ВГЧ-6А и ВГЧ-6В применен метод, описанный в статье S. Reddy и P. Manna [41]. Одностадийный вариант ПЦР проводили в одной пробирке, используя праймеры, специфичные к немедленно раннему гену (IE) вируса: forward (CTC ATA AGG TGC TGA GTG ATC AGT T) и reverse (CCT CAG TGA CAG ATC TGG GC) [41]. В данном случае используется одна пара праймеров, которые в реакции амплификации дают два разных по размеру фрагмента — 206 п.н. и 431 п.н., соответствующих ВГЧ-6А и ВГЧ-6В.

Дифференциальный ПЦР-анализ проводили в отдельных пробирках (для ВЭБ-1, ВЭБ-2 и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В). Состав реакционной смеси общим объемом 25 мкл включал следующие реагенты: праймеры (5 пкМ в реакцию) (ДНК-синтез, Россия); 5-кратный Taq Red буфер 12,5 mM Mg²⁺ (Евроген, Россия); 5 е.а. HS Taq ДНК-полимеразы (Евроген, Россия); смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (до конечной концентрации 0,1 mM) (Евроген, Россия); деионизированную воду I типа (Milli-Q Integral 3, Франция). В качестве матрицы использовали выделенную ДНК в объеме 5 мкл на реакцию. В данном исследовании для дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2 и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В 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 MaxyGene Gradient (Axygen, США).

В качестве контрольных материалов при дифференциальной ПЦР использованы положительный контроль (К+) — ДНК ВЭБ-1, ДНК ВЭБ-2, ДНК ВГЧ-6В, полученная нами в предыдущих исследованиях из лейкоцитов периферической крови пациентов с ОИМ ВЭБ- или ВГЧ6-этиологии, а также отрицательный контроль (К-) — деионизированная вода I типа.

Продукты ПЦР-амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1,8% агарозном геле, содержащем бромид этидия (0,02% по объему). В качестве стандарта для определения длины двуцепочечных молекул ДНК в интервале 100–1500 п.н. использовали маркер длин ДНК (M) 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия). Результаты детектировали на трансиллюминаторе InGenius 3 с использованием программного обеспечения GeneSys (Syngene, Великобритания). Полученные данные выражали в качественном формате — положительный или отрицательный.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием языка программирования R версии 4.0.0 (The R Foundation for Statistical Computing, Inc)¹ и среды RStudio версия 1.4.1106 (RStudio, PBC)². Принадлежность выборок к нормальному распределению определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка и графиков квантилей. Для попарного сравнения независимых выборок использован критерий Манна–Уитни и коэффициент ранговой

¹ <https://www.R-project.org>

² <http://www.rstudio.com>

корреляции Спирмена. Для поиска различий способов 1 и 2 использовали тест Уилкоксона для зависимых выборок. Рассчитанные значения p корректировали с применением поправки Холма–Бонферрони для множественных сравнений. Различия считали статистически значимыми при скорректированном $p < 0,05$. Полученные концентрации вирусной ДНК представляли в виде $Me [Q1; Q3]$ (где Me — медиана, $Q1, Q3$ — первый и третий квартили).

Результаты

На первом этапе исследования нами проведено тестирование проб вирусной ДНК, выделенной из цельной слюны без предварительной пробоподготовки (способ 1).

Количественное определение ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ-6А/В. Все образцы цельной слюны были исследованы на наличие ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ-6А/В методом количественной ПЦР-РВ. Среди детей с ОИМ ДНК ВЭБ обнаружена в 95% случаев (21/22), а ее концентрация составляла 730 455 [118 994; 5 053 700] копий/мл. Только у одного ребенка в слюне ДНК ВЭБ не детектировалась, при этом выявлялась ДНК ВГЧ-6А/В в концентрации 4866 копий/мл. В целом ДНК ВГЧ-6А/В обнаружена у 82% (18/22) обследованных пациентов при значениях концентрации ДНК вируса 15 [0; 5680] копий/мл (только у троих детей она была выше третьего квартиля).

В группе здоровых детей положительными на ДНК ВЭБ были 50% (13/26) проб слюны, ДНК ВГЧ-6А/В — 81% (21/26). При этом концентрация ДНК ВЭБ была значительно ниже, чем в группе ОИМ, — 447 [85; 2925] копий/мл ($p < 0,001$). Следует отметить, что на фоне отсутствия клинических симптомов у троих детей уровни ДНК ВЭБ отличались наиболее высокими значениями в данной группе обследованных (143 972–828 020 копий/мл) и были сопоставимы с показателями пациентов с ОИМ. Концентрация ДНК ВГЧ-6А/В у здоровых де-

тей составила 27 800 [3742; 53 437] копий/мл, что статистически значимо превысило ее значение в группе детей с ОИМ ($p = 0,009$). При этом результаты измерения тотальной ДНК в группах сравнения не различались ($p = 0,359$).

Микст-инфекция (ВЭБ+ВГЧ-6А/В) по результатам исследования слюны в группе детей с ОИМ выявлялась у 82% (18/22), а в группе здоровых детей — у 46% (12/26) обследованных.

Дифференциальная детекция ВЭБ-1/ВЭБ-2. На этапе генотипирования ВЭБ дифференциальная детекция ВЭБ-1 и ВЭБ-2 проводилась не в формате двухраундовой «гнездовой» ПЦР, описанной в статье [42], а в оптимизированном нами однораундовом варианте, который ранее применялся для дифференциальной детекции ВЭБ-1 и ВЭБ-2 в лейкоцитах периферической крови и отличался проведением амплификации в один раунд с использованием праймеров, приведенных в разделе «Материалы и методы» (исходно использовались во втором раунде ПЦР). ПЦР-анализ выполнялся для каждой пробы в двух отдельных пробирках и позволил выявлять ВЭБ-1 (497 п.н.) и ВЭБ-2 (150 п.н.) (рис. 1).

В ходе тестирования проб цельной слюны детей с ОИМ был выявлен только ВЭБ-1. Установлено, что у здоровых вирусоносителей в слюне также доминировал ВЭБ-1. При типировании ВЭБ в однораундовой ПЦР был получен отрицательный результат в одной ВЭБ-положительной пробе по результатам ПЦР-РВ.

Раздельная детекция ВГЧ-6А/ВГЧ-6В. Определение ВГЧ-6А и ВГЧ-6В проводилось в ходе однораундовой ПЦР в одной пробирке [41]. При обследовании пациентов с ОИМ в цельной слюне выявлялся только ВГЧ-6В. Дискордантность результатов увеличилась: 4 ВГЧ-6А/В-положительные пробы (по результатам ПЦР-РВ) прошли как отрицательные. В группе здоровых детей также единственным выявленным видом стал ВГЧ-6В. При исследовании материала в данной группе расхождения результатов не наблюдалось.

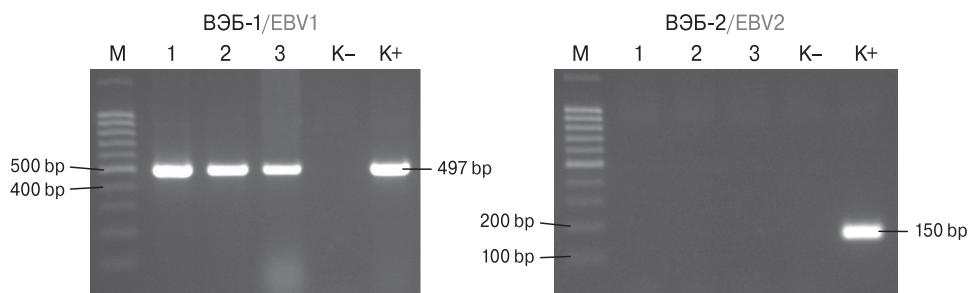


Рисунок 1. Результаты оптимизированной однораундовой ПЦР для дифференциальной детекции ВЭБ-1 и ВЭБ-2 в пробах цельной слюны пациентов с острым ВЭБ-инфекционным мононуклеозом

Figure 1. Optimized one-round PCR results for differential detection of EBV1 and EBV2 in whole saliva samples from patients with acute EBV-infectious mononucleosis

Проанализировав ситуацию с дискордантными результатами, мы установили, что в одном случае концентрация ДНК ВГЧ-6А/В составляла 5,8 копии в пробе, а в остальных количество вирусной ДНК было ≤ 1 копии в пробе. Следует отметить, что среди других пациентов и в группе здоровых детей при этих же концентрациях регистрировались и положительные результаты.

На следующем этапе для оптимизации дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2 и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В работа проводилась по двум направлениям: а) обогащение матрицы для ПЦР-анализа на основе оптимизации этапа пробоподготовки слюны; б) проведение второго раунда ПЦР с теми же праймерами, которые использовались в однораундовой ПЦР (реамплификация).

Оптимизация способа пробоподготовки слюны. На основе исследования слюны взрослых здоровых волонтеров выполнен сравнительный анализ трех ее фракций: цельная слюна без предварительной обработки (100 мкл), осадок и надосадочная жидкость, полученные из разных объемов того же образца слюны (300, 500 и 1000 мкл) после пробоподготовки путем центрифугирования при 13 000 об/мин в течение 5 минут. Этот же режим центрифугирования дополнительно применялся для последующего выделения вирусной ДНК из осадка слюны на этапе между лизированием проб и преципитацией.

На рис. 2 показано, что в образце одного и того же донора вирусная ДНК в пробах надосадочной жидкости не выявлялась ни при количественном, ни при качественном однораундовом варианте ПЦР-анализа. Отметим, что при отработке метода в отдельных случаях, когда концентрация ДНК ВЭБ в цельной слюне

превышала 1000 копий в пробе, в надосадочной жидкости выявлялась вирусная ДНК в количестве 1–2 копии в пробе.

В осадке слюны, наоборот, во всех случаях наблюдалось повышение количества копий вирусной ДНК по сравнению с цельной слюной, что также выражалось в улучшении визуализации ПЦР-фрагментов на электрофореграмме. При этом значения концентрации вирусной ДНК в осадке слюны увеличивались непропорционально объему использованного для анализа образца цельной слюны. Количество копий вирусной ДНК в пробах осадка, полученных из 1000 мкл слюны, было меньше, чем количество копий, полученных из 300 мкл. В процессе отработки метода было установлено, что объем образца более 300 мкл значительно изменял качественные характеристики большинства проб осадка слюны. В этом случае отмечалось снижение специфичности и воспроизводимости выявления вирусной ДНК в триплетах на этапе дифференциального ПЦР-анализа (появление шумов на электрофореграммах и отсутствие специфических фрагментов в повторах).

На основе полученных результатов в ходе дальнейших исследований нами применялся оптимизированный методический подход, основанный на ПЦР-анализе вирусной ДНК, выделенной модифицированным способом из осадка слюны, полученного путем центрифугирования 300 мкл образца (способ 2).

Результаты сравнения способа 1 и способа 2. Способ 2 был применен к тому же набору образцов слюны детей, что и способ 1. При попарном сравнении результатов количественной ПЦР-РВ, как суммарно среди всех обследованных, так и отдельно по группам детей с ОИМ и без клинических признаков данного заболевания, после применения способа 2 по сравнению со спо-

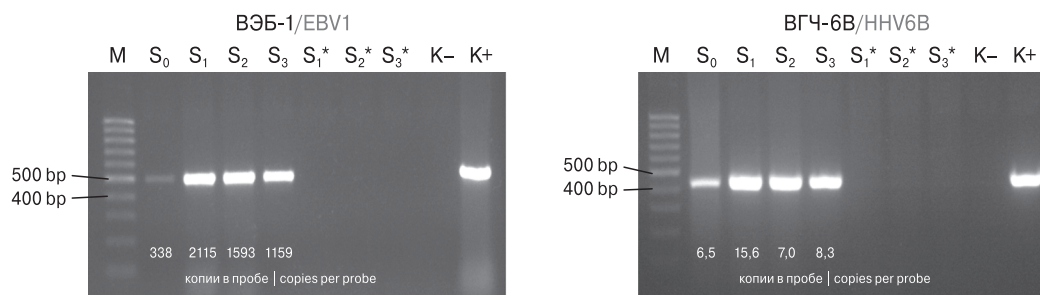


Рисунок 2. Сравнение результатов определения ВЭБ-1 и ВГЧ-6В во фракциях слюны, полученных из разных объемов образца одного донора

Figure 2. Comparison of the results on determining EBV1 and HHV6B in saliva fractions obtained from different sample volumes from the same donor

Примечание. Цельная слюна — проба S₀ (100 мкл); осадок слюны — пробы S₁ (300 мкл), S₂ (500 мкл), S₃ (1000 мкл); надосадочная жидкость — пробы S₁* (300 мкл), S₂* (500 мкл), S₃* (1000 мкл).

Note. Whole saliva — sample S₀ (100 μ l); saliva sediment — samples S₁ (300 μ l), S₂ (500 μ l), S₃ (1000 μ l); supernatant — samples S₁* (300 μ l), S₂* (500 μ l), S₃* (1000 μ l).

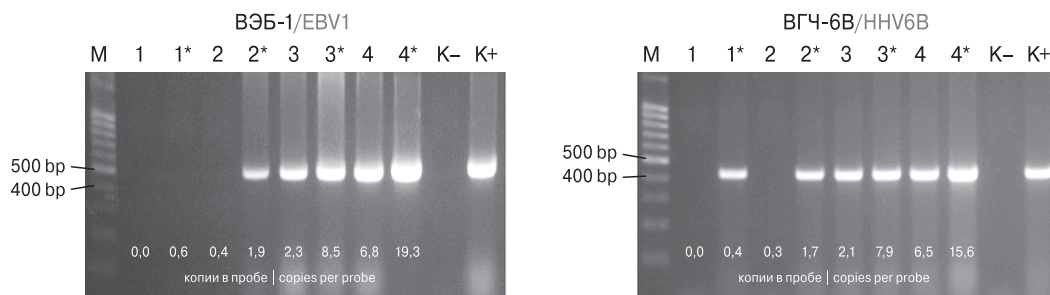


Рисунок 3. Сравнение результатов детекции ВЭБ-1 и ВГЧ-6В в пробах слюны с разными концентрациями вирусной ДНК до и после применения способа 2

Figure 3. Comparison of the results on detecting EBV1 and HHV6B in saliva samples with varying viral DNA concentrations before and after using Method 2

Примечание. Способ 1 — пробы 1, 2, 3, 4; способ 2 — пробы 1*, 2*, 3*, 4*.
Note. Method 1 — samples 1, 2, 3, 4; Method 2 — samples 1*, 2*, 3*, 4*.

способом 1 в пробах получено статистически значимое повышение концентрации ДНК ВЭБ ($p < 0,001$; $p < 0,001$; $p = 0,012$), ДНК ВГЧ-6А/В ($p < 0,001$; $p = 0,021$; $p < 0,001$) и тотальной ДНК ($p < 0,001$ для всех вариантов межгруппового сравнения). Корреляция между концентрацией вирусной и тотальной ДНК не установлена.

Способ 2 дополнительно позволил выявить ДНК ВЭБ в пяти ранее отрицательных образцах, принадлежащих условно здоровым детям. Аналогичные изменения наблюдались и для ДНК ВГЧ-6А/В у двух пациентов с ОИМ и одного здорового ребенка. Как следствие, в группе пациентов с ОИМ повысилась частота обнаружения ДНК ВГЧ-6А/В с 82 до 91% (20/22), ВЭБ+ВГЧ-6А/В с 81 до 86% (19/22). Среди условно здоровых детей доля ВЭБ-положительных лиц увеличилась с 50 до 69% (18/26), ВГЧ-6А/В-положительных индивидов с 81 до 85% (22/26), а сочетанные формы инфицирования (ВЭБ+ВГЧ-6А/В) возросли с 46 до 61,5% (16/26).

По результатам однораундового дифференциального ПЦР-анализа после выполнения

процедуры дополнительной пробоподготовки слюны ранее дискордантные пробы стали положительными на ВЭБ-1 и ВГЧ-6В. Как общая тенденция отмечалось повышение качества визуализации специфических ПЦР-фрагментов на электрофореграмме по мере увеличения концентрации вирусной ДНК в пробах (рис. 3). На примере детекции ВЭБ-1 показано, что дополнительно выявленные после применения способа 2 ВЭБ-положительные пробы могут быть дискордантными. Установлено, что в целом подобная картина отмечалась в 5 из 8 аналогичных проб в случае низкого содержания вирусной ДНК (≤ 1 копии в пробе).

На рис. 4А две пробы, содержащие ВЭБ-1, с целевыми для нас концентрациями менее 1 копии в пробе представлены в триплетах. Проведен анализ проб под номером 1* (0,6 копий в пробе) и номером 2 (0,4 копии в пробе), представленных ранее на рис. 3. Данные свидетельствуют о низкой сходимости результатов исследований при установленных предельных значениях чувствительности используемых

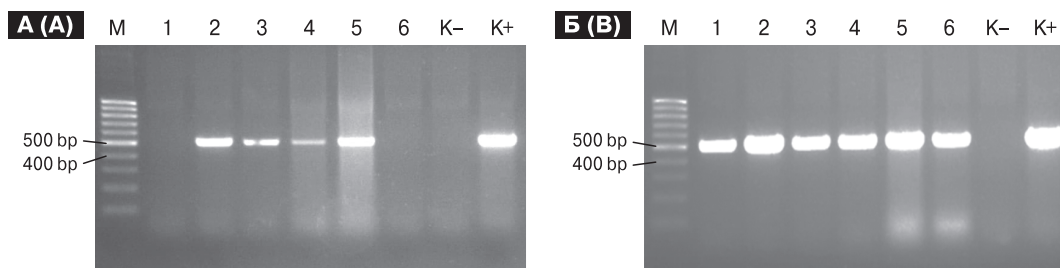


Рисунок 4. Результаты детекции ВЭБ-1 в пробах с низкой концентрацией вирусной ДНК (≤ 1 копии в пробе)

Figure 4. Results of EBV1 detection in samples with low viral DNA concentration (≤ 1 copies per probe)

Примечание. А) детекция в триплетах при концентрации ДНК 0,6 (линии 1, 2, 3) и 0,4 копии в пробе (линии 4, 5, 6); Б) реамплификация при концентрации ДНК 0,6 (линии 1, 2, 3) и 0,4 копии в пробе (линии 4, 5, 6).

Note. А) detected in triplets at DNA concentration of 0.6 (lines 1, 2, 3) and 0.4 copies per probe (lines 4, 5, 6); В) reamplification at DNA concentration of 0.6 (lines 1, 2, 3) and 0.4 copies per probe (lines 4, 5, 6).

методов. Обнаружение вирусной ДНК в этих образцах во многом может носить случайный характер независимо от применения способа 1 или способа 2.

Реамплификация, когда во втором раунде ПЦР используется матрица и праймеры, фигурирующие в первом раунде ПЦР, в пробах с низким содержанием вирусной ДНК (≤ 1 копии в пробе) позволяет повысить эффективность детекции результатов амплификации с помощью горизонтального электрофореза (рис. 4Б).

Таким образом, дифференциальная детекция ВЭБ-1/ВЭБ-2 и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В в однораундовом варианте ПЦР в сочетании со способом 2 возможна в отношении образцов цельной слюны с минимальной концентрацией вирусной ДНК > 33 копий/мл.

Следует отметить, что ни в одном из исследуемых образцов слюны, в том числе после оптимизации, ВЭБ-2 и ВГЧ-6А обнаружены не были.

Исследование динамики выделения ВЭБ и ВГЧ-6А/В со слюной. Проведена динамическая оценка концентрации ДНК ВЭБ и ДНК

ВГЧ-6А/В с помощью количественной ПЦР-РВ в серии образцов слюны, которые собирались ежедневно в течение 14 дней. На рис. 5 представлены результаты сравнительного исследования слюны условно здоровых доноров (взрослого и ребенка) с помощью способа 1 и способа 2.

Независимо от возраста доноров после применения способа 1 в исследованных образцах за весь период наблюдения отмечались ежедневные колебания концентрации вирусной ДНК. При этом наиболее выраженный размах значений наблюдался в отношении ДНК ВЭБ: от недетектируемых уровней до 10^2 – 10^3 копий в пробе (или 10^4 – 10^5 копий/мл). В этих же пробах концентрация ДНК ВГЧ-6А/В изменялась только в 4–6 раз и характеризовалась более низким уровнем по сравнению с ВЭБ, большим постоянством значений без резких перепадов и отрицательных результатов. Использование способа 2 позволило повысить концентрацию вирусной ДНК в каждой пробе и исключить период отсутствия детекции ДНК ВЭБ у взрослого донора в 11 и 12 дни наблюдения.

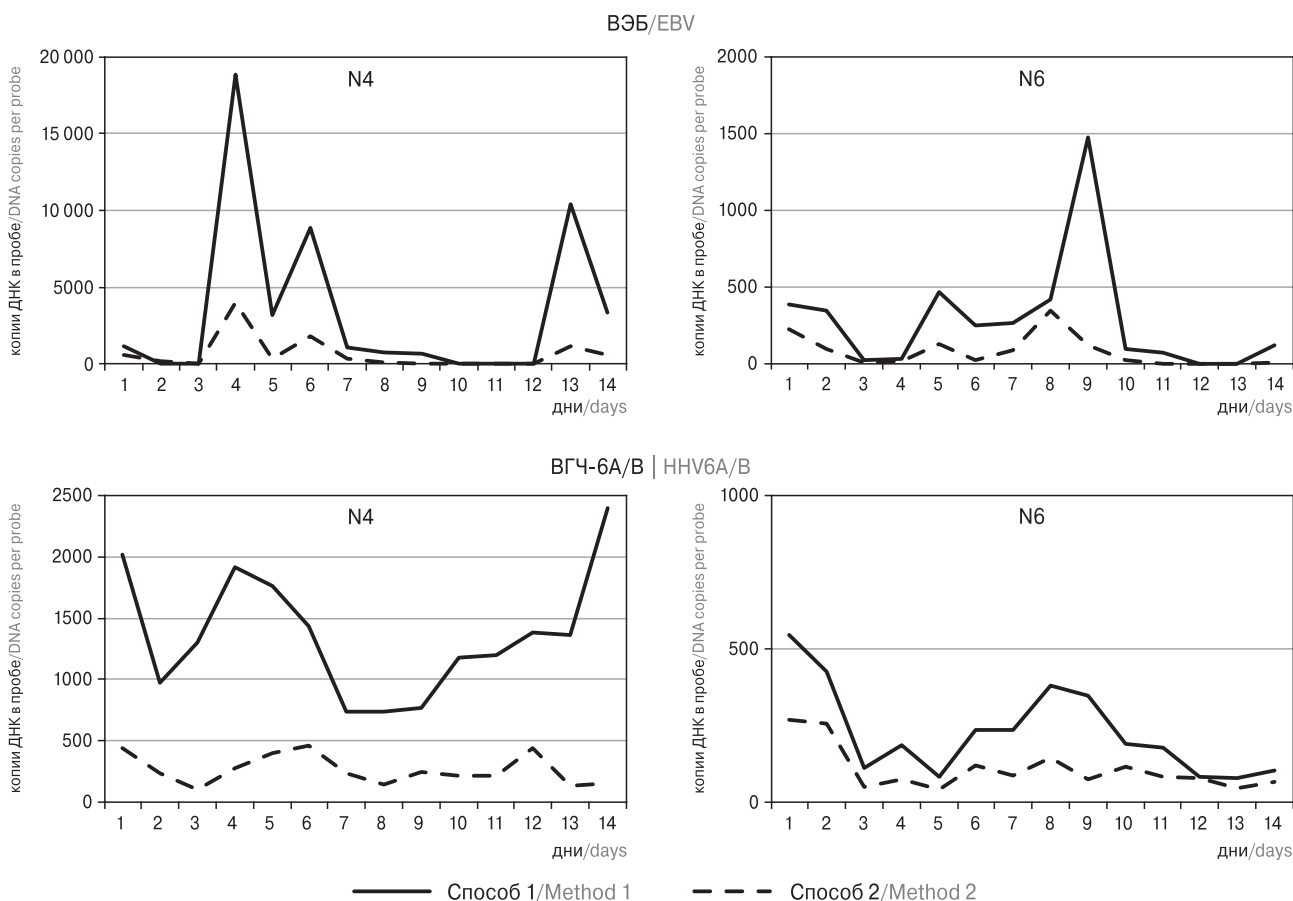


Рисунок 5. Сравнение способа 1 и способа 2 в ходе динамического наблюдения за выделением ВЭБ и ВГЧ-6А/В со слюной

Figure 5. Comparison of Method 1 and Method 2 in dynamic monitoring for EBV and HHV6A/B shedding in saliva

Примечание. N4 — взрослый донор, N6 — здоровый ребенок.

Note. N4 — adult donor, N6 — healthy child.

Сравнительный анализ результатов применения способа 2 к исследованию слюны у 6 условно здоровых доноров подтверждает, что профили кривых ежедневного выделения ВЭБ и ВГЧ-6А/В различаются и для каждого участника наблюдения индивидуальны (рис. 6).

За период наблюдения пиковые концентрации ДНК ВЭБ достигали у разных доноров значений от 1475 до 54 627 копий в пробе, а концентрации ДНК ВГЧ-6А/В — от 72 до 2401 копий в пробе. В то время как у некоторых участников (N2, N3, N5) периоды непрерывного выделения ВЭБ сменялись периодами отсутствия его детекции в слюне, у других (N1, N4, N6) отмечалось обнаруживаемое выделение вируса в течение всего времени наблюдения. Результаты исследования свидетельствуют о том, что в зависимости от дня, на который приходился сбор биоматериала, участники N2, N3 и N5 могли рассматриваться либо как ВЭБ-позитивные лица, выделяющие вирус с разной степенью интенсивности, либо, наоборот, как ВЭБ-негативные индивиды. Для детекции ДНК ВГЧ-6А/В применение способа 2 полностью нивелировало данную проблему.

По результатам дифференциального ПЦР-анализа во всех образцах слюны взрослых волонтеров также были обнаружены только ВЭБ-1 и ВГЧ-6В.

Обсуждение

В настоящее время доказана основная роль воздушно-капельного пути передачи в распространении ВЭБ- и ВГЧ-6А/В-инфекций [19, 22, 34, 37]. При сравнительном анализе различных биосубстратов ротовой полости (цельная слюна, жидкость десневой щели, секрет отдельных слюнных желез, мазки ротовой полости) наибольшая частота обнаружения вирусной ДНК была установлена в цельной слюне [40, 43]. Кроме того, слюна является легкодоступным клиническим материалом, не требующим инвазивных вмешательств, что особенно актуально при обследовании детей. Именно поэтому в нашей работе биоматериалом для исследования послужила цельная слюна.

Обращает на себя внимание тот факт, что, по данным литературы, результаты ПЦР-исследований сильно контрастируют. Так, при ОИМ частота выявления ДНК ВЭБ в слюне у детей составляет у разных авторов от 69% [5] до 100% [11]. Несмотря на то что ИМ — полиэтиологическое заболевание, определение ВГЧ-6А/В в контексте этиологической расшифровки проводилось лишь в единичных работах, а данные о частоте обнаружения вируса варьировали от 31 до 52% случаев [1, 5]. Среди условно здоровых детей

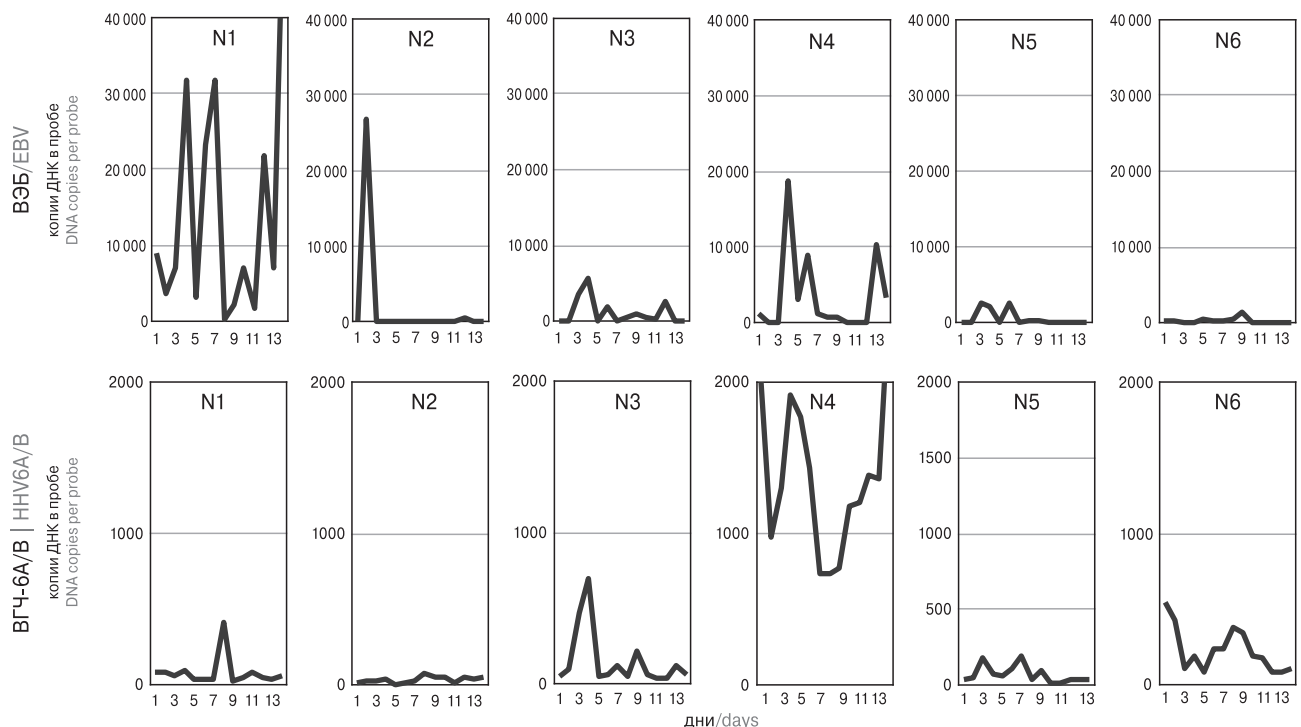


Рисунок 6. Профиль ежедневного выделения ВЭБ и ВГЧ-6А/В со слюной у здоровых доноров в течение 14 дней наблюдения (применен способ 2)

Figure 6. Daily profile of EBV and HHV6A/B shedding in saliva of healthy donors within 14 day-observation (Method 2 applied)

Примечание. N1, N2, N3, N4, N5 — взрослые доноры, N6 — здоровый ребенок.

Note. N1, N2, N3, N4, N5 — adult donors, N6 — healthy child.

ДНК ВЭБ и ВГЧ-6А/В в слюне обнаруживалась, по данным одних авторов, у 28 и 35% обследованных [16], по данным других — у 90 [35] и 66% [13, 14] соответственно. Концентрация вирусной ДНК также значительно варьирует и составляет от < 2 до 9300 копий/мл ДНК ВЭБ в слюне здоровых детей [25, 30].

В числе возможных причин этих различий специалисты чаще всего отмечают популяционные особенности исследуемых групп из разных географических регионов, отсутствие стандартизированных лабораторных протоколов, представление количественных результатов в разных единицах измерения, наличие в слюне ингибиторов, которые мешают амплификации ДНК и обуславливают ложноотрицательные результаты [30, 31]. Еще одним важным аспектом данной проблемы, на который мало обращают внимание, является недостаточность информации об особенностях динамики выделения вируса со слюной. В зарубежных исследованиях сообщается о выраженном стохастическом характере обнаружения ДНК ВЭБ как в течение суток [24], так и ежедневно [17], еженедельно [33], ежемесячно [29]. В то время как одни авторы демонстрировали 30-кратную разницу между максимальным и минимальным количеством ВЭБ за один день [24], другие установили колебания его концентрации до 5 логарифмов в течение более длительного периода наблюдения, вплоть до перемежающихся отрицательных результатов детекции [23]. Мониторинг вирусной нагрузки ВГЧ-6А/В в слюне проводился преимущественно в проспективных исследованиях, посвященных изучению времени первичного инфицирования детей [22, 33, 34], реже при обследовании здоровых вирусоносителей [36]. Как правило, выделение ВГЧ-6А/В отличалось непрерывным характером и относительно низкой вирусной нагрузкой [33]. Механизмы, лежащие в основе регуляции выделения ВЭБ и ВГЧ-6А/В со слюной, остаются до конца не изученными [9, 23, 26].

Результаты наших собственных исследований подтверждают, что применение разных методических подходов при тестировании одних и тех же образцов генерирует отличающиеся по своей сути данные. Применение оптимизированного нами способа пробоподготовки слюны позволило повысить концентрацию вирусной и тотальной ДНК в пробах и, как следствие, частоту выявления ДНК ВЭБ на 19%, ДНК ВГЧ-6А/В на 4–9%, сочетанных форм инфекции на 15,5% (по результатам количественной ПЦР-РВ). Достигнутые преимущества отразились в том числе на эффективности обнаружения ДНК вирусов, минимизируя вероятность получения ложноотрицательных

результатов при динамическом исследовании образцов слюны в течение 14 дней. На примере исследования образцов слюны вирусоносителей (детей и взрослых) показано, что для ВЭБ характерны резкие колебания вирусной нагрузки вплоть до недетектируемых уровней, а также более высокие пиковые концентрации в сравнении с ВГЧ-6А/В. Таким образом, инфицированность или интенсивность выделения ВЭБ у каждого человека не может быть достоверно определена из исследования единственного образца слюны. Однако в клинической и, в частности, педиатрической практике однократный забор биологического материала является наиболее распространенным диагностическим подходом. В то время как механизмы регуляции выделения ВЭБ со слюной являются отдельным направлением зарубежных исследований [23, 26], для ВГЧ-6А/В этот вопрос в литературе не освещен. Мы полагаем, что более постоянный и равномерный характер обнаружения ВГЧ-6А/В у здоровых волонтеров может быть следствием латенции вируса в эпителиальных клетках слюнных желез и/или ротоглотки в уникальной для него хромосомно-интегрированной форме.

Полученные нами данные о частоте обнаружения вирусной ДНК свидетельствуют о высокой доле здоровых вирусоносителей ВЭБ и ВГЧ-6А/В среди детей — жителей Нижегородского региона (69 и 85% соответственно). В более раннем исследовании нижегородских ученых распространенность ВЭБ составляла 52% [2], что согласуется с нашими данными (50%), полученными с помощью способа 1. Микстинфекция детектировалась у 61,5% обследованных, в то время как более ранние наблюдения российских исследователей свидетельствуют о том, что у детей разного возраста инфицированность ВЭБ+ВГЧ-6А/В изменяется от 25 до 60% [7].

Установлено, что концентрация ДНК ВЭБ в группе детей с ОИМ достигала высоких значений — 730 455 [118 994; 5 053 700] копий/мл. В этой же группе концентрация ДНК ВГЧ-6А/В отличалась наименьшими, даже по сравнению с группой здоровых детей, показателями (15 [0; 5680] против 27 800 [3742; 53 437] копий/мл; $p = 0,009$). Следует отметить, что на этапе дизайна данного исследования был сделан выбор в пользу использования отдельных (ориентированных на конкретный вирус), а не мультиплексных тест-систем для количественной ПЦР. Именно поэтому можно предположить, что выявленные особенности отражают существующие механизмы конкурентного взаимодействия ВЭБ и ВГЧ-6А/В в организме человека при определенных условиях. Подобные наблюдения описаны ранее в публикациях, по-

священных исследованиям ВГЧ-6 и ВИЧ [18], а также ВЭБ и вируса саркомы Капоши [38], и требуют дальнейшего изучения.

В России типирование ВЭБ и ВГЧ-6А/В в слюне до настоящего времени не проводилось. По результатам зарубежных исследований у детей и взрослых в слюне доминирующим типом ВЭБ во всем мире является ВЭБ-1 (70–90%) [28, 44]. В современных работах продемонстрирована принципиальная возможность обнаружения в слюне детей ВГЧ-6А и ВГЧ-6В [30, 32, 34, 36]. В основном преобладает ВГЧ-6В (96–100%), а ВГЧ-6А детектируется значительно реже. Однако встречаются публикации, согласно которым ВГЧ-6А выделяется со слюной у большей части детей в возрасте до 4 лет [32]. Открытым остается вопрос, обусловлена ли частота обнаружения преимущественно ВГЧ-6В какими-либо техническими и физиологическими детерминантами или является реальным отражением более активного участия данного вида вируса в развитии инфекционной патологии человека по сравнению с ВГЧ-6А [14].

Оптимизированный в данной работе методический подход позволяет отдельно детектировать ВГЧ-6А, ВГЧ-6В и основные типы ВЭБ по единому лабораторному протоколу, а в сочетании с предварительной пробоподготовкой слюны повышает диагностическую чувствительность ПЦР-анализа, минимизирует долю дискордантных и ложноотрицательных результатов.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что у обследованных детей Нижегородского региона доминирует ВЭБ-1 и ВГЧ-6В, что согласуется с существующими представлениями об их географическом распределении на прилегающих территориях [8, 12]. ВЭБ-2 и ВГЧ-6А в слюне не были обнаружены ни в одной из исследуемых групп детей, а также у взрослых.

Для клинико-эпидемиологической характеристики ВГЧ-6А, ВГЧ-6В, а также типов ВЭБ-1/ВЭБ-2 требуются дальнейшие более масштабные исследования.

Заключение

На основе метода ПЦР оптимизированы методические подходы для дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2 и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В в слюне.

Впервые в России проведен отдельный анализ ВГЧ-6А, ВГЧ-6В и основных типов ВЭБ в слюне. Представлены первые результаты 14-дневного динамического мониторинга выделения вирусов со слюной у здоровых вирусносителей (взрослых и детей). Установлено, что цельная слюна является доступным, неинвазивным клиническим материалом для выделения вирусной ДНК с целью изучения генетического разнообразия ВЭБ и ВГЧ-6А/В. Показано, что определение ДНК ВЭБ в единственном образце слюны не позволяет достоверно оценить инфицированность лиц или интенсивность выделения ВЭБ. ВГЧ-6А/В характеризуется более постоянным и равномерным выделением.

Оптимизация отдельной детекции основных типов ВЭБ, а также видов ВГЧ-6А и ВГЧ-6В основывалась 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 и делает его экономически целесообразным. Другой аспект оптимизации направлен на концентрирование вирусной ДНК в образцах цельной слюны с целью обогащения матрицы для ПЦР-анализа, что особенно важно при низкой вирусной нагрузке и позволяет повысить чувствительность исследования, а также снизить долю ложноотрицательных результатов.

Среди пациентов с ОИМ и в контрольной группе установлено преобладание ВЭБ-1 и ВГЧ-6В. ВЭБ-2 и ВГЧ-6А не детектировались ни в одном из исследованных образцов слюны.

Описанный в рамках настоящего исследования методический подход может применяться в диагностических, эпидемиологических и научно-исследовательских целях.

Список литературы/References

1. Бабаченко И.В., Шарипова Е.В., Мурина Е.А. Современные подходы к диагностике инфекционного мононуклеоза у детей // Клиническая больница. 2012. № 4 (03). С. 62–66. [Babachenko I.V., Sharipova E.V., Murina E.A. Contemporary approaches to the diagnosis of infectious mononucleosis in children. *Klinicheskaya bolnitsa = The Hospital*, 2012, no. 4 (03), pp. 62–66. (In Russ.)]
2. Бруснигина Н.Ф., Сперанская Е.В., Черневская О.М., Махова М.А., Орлова К.А., Клемина Н.Н. Анализ распространенности вирусов семейства Herpesviridae среди детей Нижнего Новгорода // Медицинский альманах. 2013. № 2. С. 99–103. [Brusnigina N.F., Speranskaya E.V., Chernevskaya O.M., Makhova M.A., Orlova K.A., Klenina N.N. Analysis of the prevalence of viruses of the Herpesviridae family among children of Nizhny Novgorod. *Meditsinskiy almanakh = Medical Almanac*, 2013, no. 2, pp. 99–103. (In Russ.)]
3. Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики: методические рекомендации. М.: ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. 34 с. [Taking, transportation, storage of clinical material for PCR diagnostics: methodological recommendations. *Moscow: Central Research Institute of Epidemiology of the Rospotrebnadzor*, 2012. 34 p. (In Russ.)]

4. Демина О.И., Тихомиров Д.С., Чеботарева Т.А., Мазанкова Л.Н., Туполева Т.А. Клиническая значимость вирусологических методов верификации этиологии инфекционного мононуклеоза // *Детские инфекции*. 2020. Т. 19, № 2. С. 29–37. [Demina O.I., Tikhomirov D.S., Chebotareva T.A., Mazankova L.N., Tupoleva T.A. Clinical relevance of virological verification methods for the etiology of infectious mononucleosis. *Detskie infektsii = Children Infections*, 2020, vol. 19, no. 2, pp. 29–37. (In Russ.)] doi: 10.22627/2072-8107-2020-19-2-29-37
5. Климова Р.Р., Сотников И.А., Чичев Е.В., Егорова Н.Ю., Околышева Н.В., Кистенева Л.Б., Учайкин В.Ф., Куш А.А. Сравнительный анализ частоты встречаемости маркеров герпесвирусных инфекций в клинических материалах у детей с различными инфекционными патологиями // *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2014. № 4. С. 33–38. [Klimova R.R., Sotnikov I.A., Chichev E.V., Egorova N.Yu., Okolyshcheva N.V., Kisteneva L.B., Uchaikin V.F., Kush A.A. Comparative analysis of the frequency of herpesvirus infection markers in clinical samples from children with various infectious diseases. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2014, no. 4, pp. 33–38. (In Russ.)]
6. Лысенкова М.Ю., Мелехина Е.В., Каражас Н.В., Свитич О.А., Веселовский П.А., Рыбалкина Т.Н., Бошьян Р.Е., Косенчук В.В., Музыка А.Д., Горелов А.В., Усенко Д.В., Иванова М.Ю. Клинико-эпидемиологические особенности ВГЧ-6А- и ВГЧ-6В-инфекции у детей г. Москвы // *Детские инфекции*. 2019. Т. 18, № 1. С. 11–16. [Lysenkova M.Yu., Melekhina E.V., Karazhas N.V., Svitich O.A., Veselovsky P.A., Rybalkina T.N., Boshyan R.E., Kosenchuk V.V., Muzyka A.D., Gorelov A.V., Usenko D.V., Ivanova M.Yu. The clinical and epidemiological features of HHV-6A and HHV-6B infections in children of Moscow. *Detskie infektsii = Children Infections*, 2019, vol. 18, no. 1, pp. 11–16. (In Russ.)] doi: 10.22627/2072-8107-2019-18-1-11-16
7. Мелехина Е.В., Николаева С.В., Солдатова Е.Ю., Музыка А.Д., Горелов А.В. Место инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6А/В, в детской популяции // *Русский медицинский журнал*. 2019. № 10. С. 17–21. [Melekhina E.V., Nikolaeva S.V., Soldatova E.Yu., Muzyka A.D., Gorelov A.V. Human herpesvirus 6 variant A/B infections in child population. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2019, no. 10, pp. 17–21. (In Russ.)]
8. 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. *Pediatrria = Pediatrics*, 2019, vol. 98, no. 1, pp. 53–56. (In Russ.)] doi: 10.24110/0031-403X-2019-98-1-53-56
9. Пермякова А.В., Сажин А.В., Мелехина Е.В., Горелов А.В. Возможности биологического и математического моделирования инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр // *Педиатрия*. 2020. Т. 99, № 6. С. 226–231. [Permyakova A.V., Sazhin A.V., Melekhina E.V., Gorelov A.V. Possibilities of biological and mathematical modeling of the infection caused by Epstein–Barr virus. *Pediatrria = Pediatrics*, 2020, vol. 99, no. 6, pp. 226–231. (In Russ.)] doi: 10.24110/0031-403X-2020-99-6-226-231
10. Попкова М.И., Уткин О.В., Брызгалова Д.А. Сравнительная характеристика бета-герпес-вирусов человека 6А и 6В. Современный взгляд на проблему // *Журнал инфектологии*. 2021. Т. 13, № 3. С. 5–18. [Popkova M.I., Utkin O.V., Bryzgalova D.A. Comparative characteristics of human betaherpesviruses 6A and 6B. A modern view on the problem. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2021, vol. 13, no. 3, pp. 5–18. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2021-13-3-5-18
11. Попова О.А., Хохлова З.А. Персистенция ДНК ВЭБ у детей, перенесших инфекционный мононуклеоз // *Российский иммунологический журнал*. 2018. Т. 12, № 4. С. 728–730. [Popova O.A., Khokhlova Z.A. Persistence of VEB DNA in children after the infectious mononucleosis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, vol. 12, no. 4, pp. 728–730. (In Russ.)] doi: 10.31857/S102872210002654-4
12. Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Лубенская А.К., Душенькина Т.Е., Гурцевич В.Э. Древние варианты вируса Эпштейна–Барр (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): гипотезы и факты // *Вопросы вирусологии*. 2020. Т. 65, № 2. С. 77–86. [Smirnova K.V., Senyuta N.B., Lubenskaya A.K., Dushenkina T.E., Gurtsevich V.E. Ancient variants of the Epstein–Barr virus (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): hypotheses and facts. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 77–86. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-2020-65-2-77-86
13. 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
14. Agut H., Bonnafous P., Gautheret-Dejean A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, vol. 28, no. 2, pp. 313–335. doi: 10.1128/CMR.00122-14
15. Ahmadi M., Karimi A., Rafiei Tabatabaei S., Fallah F., Shiva F. Detection of 5 latent herpes viruses and Pneumocystis jirovecii in saliva of healthy children by PCR. *Arch. Pediatr. Infect. Dis.*, 2014, vol. 2, no. 1, pp. 160–163. doi: 10.5812/pedinfect.11509
16. Bartolini L., Piras E., Sullivan K., Gillen S., Bumbut A., Lin C.-T.M., Leibovitch E.C., Graves J.S., Waubant E.L., Chamberlain J.M., Gaillard W.D., Jacobson S. Detection of HHV-6 and EBV and cytokine levels in saliva from children with seizures: results of a multi-center cross-sectional study. *Front. Neurol.*, 2018, vol. 9: 834. doi: 10.3389/fneur.2018.00834
17. Byrne C.M., Johnston C., Orem J., Okuku F., Huang M.L., Rahman H., Wald A., Corey L., Schiffer J.T., Casper C., Coombs D., Gantt S. Examining the dynamics of Epstein–Barr virus shedding in the tonsils and the impact of HIV-1 coinfection on daily saliva viral loads. *PLoS Comput. Biol.*, 2021, vol. 17, no. 6: e1009072. doi: 10.1371/journal.pcbi.1009072
18. Catusse J., Parry C.M., Dewin D.R., Gompels U.A. Inhibition of HIV-1 infection by viral chemokine U83A via high-affinity CCR5 interactions that block human chemokine-induced leukocyte chemotaxis and receptor internalization. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 9, pp. 3633–3639. doi: 10.1182/blood-2006-08-042622

19. Cederberg L.E., Rabinovitch M.D., Grimm-Geris J.M., Schmeling D.O., Filtz E.A., Condon L.M., Balfour H.H. Jr. Epstein–Barr virus DNA in parental oral secretions: a potential source of infection for their young children. *Clin. Infect. Dis.*, 2019, vol. 68, no. 2, pp. 306–312. doi: 10.1093/cid/ciy464
20. 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
21. Dunn N., Kharlamova N., Fogdell-Hahn A. The role of herpesvirus 6A and 6B in multiple sclerosis and epilepsy. *Scand. J. Immunol.*, 2020, vol. 92, no. 6: e12984. doi: 10.1111/sji.12984
22. Gantt S., Orem J., Krantz E.M., Morrow R.A., Selke S., Huang M.L., Schiffer J.T., Jerome K.R., Nakaganda A., Wald A., Casper C., Corey L. Prospective characterization of the risk factors for transmission and symptoms of primary human herpesvirus infections among ugandan infants. *J. Infect. Dis.*, 2016, vol. 214, no. 1, pp. 36–44. doi: 10.1093/infdis/jiw076
23. Hadinoto V., Shapiro M., Sun C.C., Thorley-Lawson D.A. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 7: e1000496. doi: 10.1371/journal.ppat.1000496
24. Holden D.W., Gold J., Hawkes C.H., Giovannoni G., Saxton J.M., Carter A., Sharrack B. Epstein–Barr virus shedding in multiple sclerosis: similar frequencies of EBV in saliva across separate patient cohorts. *Mult. Scler. Relat. Disord.*, 2018, vol. 25, pp. 197–199. doi: 10.1016/j.msard.2018.07.041
25. Hug M., Dorner M., Fröhlich F.Z., Gysin C., Neuhaus D., Nadal D., Berger C. Pediatric Epstein–Barr virus carriers with or without tonsillar enlargement may substantially contribute to spreading of the virus. *J. Infect. Dis.*, 2010, vol. 202, no. 8, pp. 1192–1199. doi: 10.1086/656335
26. Huynh G.T., Rong L. Modeling the dynamics of virus shedding into the saliva of Epstein–Barr virus positive individuals. *J. Theor. Biol.*, 2012, vol. 310, pp. 105–114. doi: 10.1016/j.jtbi.2012.05.032
27. Kourieh A., Gheit T., Tommasino M., Dalstein V., Clifford G.M., Lacau St Guily J., Clavel C., Franceschi S., Combes J.D.; SPLIT Study Group. Prevalence of human herpesviruses infections in nonmalignant tonsils: The SPLIT study. *J. Med. Virol.*, 2019, vol. 91, no. 4, pp. 687–697. doi: 10.1002/jmv.25338
28. Kwok H., Chan K.W., Chan K.H., Chiang A.K. Distribution, persistence and interchange of Epstein–Barr virus strains among PBMC, plasma and saliva of primary infection subjects. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 3: e0120710. doi: 10.1371/journal.pone.0120710
29. Lee J.S., Lacerda E.M., Nacul L., Kingdon C.C., Norris J., O’Boyle S., Roberts C.H., Palla L., Riley E.M., Cliff J.M. Salivary DNA Loads for human herpesviruses 6 and 7 are correlated with disease phenotype in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Front. Med. (Lausanne)*, 2021, vol. 8: 656692. doi: 10.3389/fmed.2021.656692
30. Leibovitch E.C., Lin C.M., Billioux B.J., Graves J., Waubant E., Jacobson S. Prevalence of salivary human herpesviruses in pediatric multiple sclerosis cases and controls. *Mult. Scler.*, 2019, vol. 25, no. 5, pp. 644–652. doi: 10.1177/1352458518765654
31. Magalhães I.M., Martins R.V., Cossatis J.J., Cavaliere R.M., Afonso L.A., Moysés N., Oliveira S.A., Cavalcanti S.M. Detection of human herpesvirus 6 and 7 DNA in saliva from healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 2010, vol. 105, no. 7, pp. 925–927. doi: 10.1590/s0074-02762010000700015
32. Magalhães I.M., Martins R.V., Vianna R.O., Moysés N., Afonso L.A., Oliveira S.A., Cavalcanti S.M. Detection of human herpesvirus 7 infection in young children presenting with exanthema subitum. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 2011, vol. 106, no. 3, pp. 371–373. doi: 10.1590/s0074-02762011000300020
33. Matrajt L., Gantt S., Mayer B.T., Krantz E.M., Orem J., Wald A., Corey L., Schiffer J.T., Casper C. Virus and host-specific differences in oral human herpesvirus shedding kinetics among Ugandan women and children. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1: 13105. doi: 10.1038/s41598-017-12994-0
34. Mayer B.T., Krantz E.M., Wald A., Corey L., Casper C., Gantt S., Schiffer J.T. Estimating the Risk of human herpesvirus 6 and cytomegalovirus transmission to ugandan infants from viral shedding in saliva by household contacts. *Viruses*, 2020, vol. 12, no. 2: 171. doi: 10.3390/v12020171
35. Mbulaiteye S.M., Walters M., Engels E.A., Bakaki P.M., Ndugwa C.M., Owor A.M., Goedert J.J., Whitby D., Biggar R.J. High levels of Epstein–Barr virus DNA in saliva and peripheral blood from Ugandan mother–child pairs. *J. Infect. Dis.*, 2006, vol. 193, no. 3, pp. 422–426. doi: 10.1086/499277
36. Miura H., Ihira M., Kozawa K., Kawamura Y., Higashimoto Y., Hattori F., Yoshikawa T. Effect of *Lactococcus lactis* strain plasma on HHV-6 and HHV-7 shedding in saliva: a prospective observational study. *Microorganisms*, 2021, vol. 9, no. 8: 1683. doi: 10.3390/microorganisms9081683
37. Miyazaki Y., Namba H., Torigoe S., Watanabe M., Yamashita N., Ogawa H., Morishima T., Yamada M. Monitoring of human herpesviruses-6 and -7 DNA in saliva samples during the acute and convalescent phases of exanthem subitum. *J. Med. Virol.*, 2017, vol. 89, no. 4, pp. 696–702. doi: 10.1002/jmv.24690
38. Newton R., Labo N., Wakeham K., Marshall V., Roshan R., Nalwoga A., Sebina I., Muhangi L., Webb E.L., Miley W., Rochford R., Elliott A.M., Whitby D. Determinants of gammaherpesvirus shedding in saliva among ugandan children and their mothers. *J. Infect. Dis.*, 2018, vol. 218, no. 6, pp. 892–900. doi: 10.1093/infdis/jiy262
39. Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., Corton C., Correia S., Ba Abdullah M.M., Watson S.J., Cotten M., Arrand J.R., Murray P.G., Allday M.J., Rickinson A.B., Young L.S., Farrell P.J., Kellam P. Genome diversity of Epstein–Barr virus from multiple tumor types and normal infection. *J. Virol.*, 2015, vol. 89, no. 10, pp. 5222–5237. doi: 10.1128/JVI.03614-14
40. Pereira C.M., Gasparetto P.F., Corrêa M.E., Costa F.F., de Almeida O.P., Barjas-Castro M.L. Human herpesvirus 6 in oral fluids from healthy individuals. *Arch. Oral Biol.*, 2004, vol. 49, no. 12, pp. 1043–1046. doi: 10.1016/j.archoralbio.2004.06.002
41. 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, no. 7, pp. 530–541. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.04.010
42. 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

43. Yap T., Khor S., Kim J.S., Kim J., Kim S.Y., Kern J.S., Martyres R., Varigos G., Chan H.T., McCullough M.J., Thomas M.L., Scardamaglia L. Intraoral human herpes viruses detectable by PCR in majority of patients. *Oral Dis.*, 2021, vol. 27, no. 2, pp. 378–387. doi: 10.1111/odi.13523
44. Yea C., Tellier R., Chong P., Westmacott G., Marrie R.A., Bar-Or A., Banwell B.; Canadian Pediatric Demyelinating Disease Network. Epstein–Barr virus in oral shedding of children with multiple sclerosis. *Neurology*, 2013, vol. 81, no. 16, pp. 1392–1399. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a841e4

Авторы:

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

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

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

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

Соболева Е.А., врач-инфекционист, 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 Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Филатова Е.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Кулова Е.А., к.м.н., врач-инфекционист, аллерголог-иммунолог ООО «Тонус Кроха и семейная стоматология», 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), Head of 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;

Soboleva E.A., Infectologist, Assistant Professor, Infectious Diseases Department, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 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;

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

Kulova E.A., PhD (Medicine), Infectologist, Allergologist and Immunologist, Tonus Krokha and Family Dentistry Clinic LLC, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

СУБПОПУЛЯЦИИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МОНОЦИТОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ВИРУСНЫМ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ

О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова, И.В. Меледина, О.И. Желтова, Е.Я. Шевела,
А.А. Останин, Е.Р. Черных

ФГБНУ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Вирусные гепатиты остаются одной из ведущих причин развития цирроза печени (ЦП). Моноциты, способные мигрировать в печень и участвовать в процессах воспаления и фиброгенеза, играют важную роль в патогенезе ЦП, что подтверждается сопряженностью отдельных субпопуляций моноцитов с тяжестью заболевания и летальностью при алкогольном и билиарном ЦП. Однако при вирусном ЦП патогенетическая и прогностическая значимость моноцитов остается малоизученной. Целью работы стало изучение нарушений в популяции циркулирующих моноцитов, включая классические (CD14⁺⁺CD16⁻, кМо), промежуточные (CD14⁺⁺CD16⁺, пМо) и неклассические моноциты (CD14⁺CD16⁺⁺, нМо) у больных вирусным ЦП, а также сопряженности этих субпопуляций с характеристиками вируса, тяжестью и прогрессией ЦП через 12 мес. после комплексной терапии. По сравнению с донорами, у больных вирусным ЦП выявлено достоверное возрастание пМо и нМо, тенденция к снижению кМо и двукратное уменьшение индекса кМо/пМо. Эти изменения не зависели от типа вирусной инфекции (HCV против HBV/HDV) и репликации вируса (репликация против интегративной фазы), однако ассоциировались с тяжестью ЦП. Так, содержание пМо прямо коррелировало с лабораторными индикаторами печеночной недостаточности, баллом Чайлда–Пью ($r_s = 0,57$; $p = 0,001$) и MELD ($r_s = 0,41$; $p = 0,033$). ROC-анализ показал, что кМо/пМо-индекс при значениях $< 9,5$ прогнозирует риск прогрессии ЦП с чувствительностью 83,3% и специфичностью 76,2%. Возрастание пМо, нМо и снижение индекса кМо/пМо наблюдалось также при алкогольном и билиарном/аутоиммунном ЦП. Однако в этом случае тяжесть ЦП обратно коррелировала с субпопуляциями CD16⁺-моноцитов, в частности с долей пМо и нМо, соответственно, при алкогольном и билиарном ЦП, свидетельствуя о протективной роли этих субпопуляций. Таким образом, при вирусном ЦП изменения структуры циркулирующих моноцитов в сторону увеличения пМо и нМо и снижения кМо не связано с типом и репликацией вируса; в отличие от алкогольного и билиарного ЦП содержание пМо прямо коррелирует с индикаторами печеночных повреждений и тяжестью ЦП; индекс кМо/пМо является биомаркером ответа на терапию/прогрессии заболевания.

Ключевые слова: субпопуляции моноцитов, вирусный цирроз печени, тяжесть заболевания, прогноз, ROC-анализ.

Адрес для переписки:

Леплина Ольга Юрьевна
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14,
ФГБНУ Научно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии.
Тел.: 8 (383) 228-21-01. Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: oleplina@mail.ru; ct_lab@mail.ru

Contacts:

Olga Yu. Leplina
630099, Russian Federation, Novosibirsk, Yadrintsevskaya str., 14,
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology.
Phone: +7 (383) 228-21-01. Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: oleplina@mail.ru; ct_lab@mail.ru

Для цитирования:

Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Меледина И.В., Желтова О.И.,
Шевела Е.Я., Останин А.А., Черных Е.Р. Субпопуляции циркулирующих
моноцитов как потенциальные биомаркеры тяжести заболевания
у больных вирусным циррозом печени // Инфекция и иммунитет. 2022.
Т. 12, № 3. С. 475–485. doi: 10.15789/2220-7619-CMS-1810

Citation:

Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Meledina I.V., Zheltova O.I., Shevela E.Ya.,
Ostanin A.A., Chernykh E.R. Topical issues of clinical symptoms and
diagnostics of septic shock // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 475–485. doi: 10.15789/2220-
7619-CMS-1810

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований (FGMN-2021-0003, интернет-номер 1021062512015-4) и поисковых научных исследований (FGMN-2020-0002, интернет-номер 1021032424289-2).

The work was carried out at the expense of the federal budget for basic scientific research (FGMN-2021-0003, Internet number 1021062512015-4) and exploratory scientific research (FGMN-2020-0002, Internet number 1021032424289-2).

TOPICAL ISSUES OF CLINICAL SYMPTOMS AND DIAGNOSTICS OF SEPTIC SHOCK

Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Meledina I.V., Zheltova O.I., Shevela E.Ya., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Viral hepatitis remains the most common cause of liver cirrhosis (LC). Monocytes, capable of migrating to the liver and participating in inflammation and fibrogenesis, play an important role in the LC pathogenesis as confirmed by the association of certain monocyte subsets with the disease severity and mortality in alcoholic and biliary LC. However, the clinical and prognostic relevance of monocytes in viral LC remains poorly investigated. This study was aimed to investigate the disturbances in circulating monocytes including classical (CD14⁺CD16⁻, cMo), intermediate (CD14⁺CD16⁺, iMo) and non-classical monocytes (CD14⁺CD16⁺⁺, nMo) in patients with viral LC, as well as their correlation with viral characteristics, LC severity and progression of the disease 12 months after combination therapy. A significant increase in iMo and nMo, cMo level tended to decrease, and a two-fold decline in cMo/iMo ratio was revealed in patients with viral LC vs. healthy donors. These changes in monocyte pattern did not depend on the type of virus (HCV vs HBV/HDV) or its replication (replication vs the integrative phase), but were associated with the LC severity. The iMo level was positively correlated with laboratory indicators of liver damage, Child–Pugh ($r_s = 0.57$; $P = 0.001$) and MELD score ($r_s = 0.41$; $P = 0.033$). ROC analysis showed that the cMo/iMo ratio at < 9.5 allowed to predict the risk of LC progression with a sensitivity of 83.3% and a specificity of 76.2%. Of note, in comparison groups patients with alcoholic or biliary/autoimmune LC also demonstrated increased frequencies in iMo and nMo and decreased cMo/iMo ratio. However, in this case, the LC severity was negatively correlated with CD16⁺monocytes, particularly with the iMo and nMo subset, respectively, in alcoholic and biliary LC, evidencing the protective role of such cell subsets. Thus in viral LC the changes in circulating monocyte profile to increased iMo and nMo as well as decreased cMo are not associated with the virus type and replication; in contrast to the alcoholic and biliary/autoimmune LC, the level of iMo directly correlates with the indicators of liver damage and LC severity; cMo/iMo ratio is a biomarker of therapy response/disease progression.

Key words: *monocyte subsets, viral liver cirrhosis, disease severity, prognosis, ROC-analysis.*

Введение

Цирроз печени (ЦП) является тяжелым бременем для здоровья населения во всем мире в связи с ростом заболеваемости, потерей трудоспособности, высокой смертностью и большими затратами на лечение. По данным систематического анализа, в 2017 г. в мире ЦП стал причиной смерти более чем 1,3 млрд пациентов. При этом, несмотря на наличие эффективных методов профилактики и лечения инфекций, обусловленных вирусом гепатита В (HBV) и С (HCV), вирусные гепатиты по-прежнему остаются ведущими причинами развития цирроза печени и его осложнений. Так, в структуре смертности 55% приходится на ЦП вирусной этиологии [7].

В свете современных представлений ЦП рассматривается как мультисистемное заболевание, в патогенезе которого центральную роль играют иммунные дисфункции. Согласно этой концепции, нарушения в иммунной системе на стадиях компенсированного ЦП (независимо от его этиологии) проявляются избыточным воспалением, обусловленным высвобождением молекул опасности (DAMPs) из поврежденных гепатоцитов. По мере прогрессии и декомпенсации заболевания, ассоциированных с транслокацией кишечной флоры, провоспалительный ответ сменяется противовоспалительным ответом с развитием иммунодепрессии, манифестирующей в виде «иммунологического паралича» на стадии быстрого развития печеночной недостаточности [2]. Учитывая этот факт, изучение

иммунных нарушений у пациентов ЦП является неперемным условием для выявления новых мишеней и прогностических биомаркеров.

Иммунные дисфункции при ЦП во многом обусловлены клетками врожденного иммунитета. Среди них большое значение уделяется моноцитам, участвующим в защите от патогенов, воспалении и фиброгенезе [3, 13]. Циркулирующие моноциты представляют гетерогенную и крайне пластичную популяцию миелоидных клеток, выполняют множество функций (антигенпрезентирующую, регуляторную, цитотоксическую, репаративную) и являются источником макрофагов и дендритных клеток [3]. В периферической крови моноциты представлены 3 субпопуляциями — классическими (кМо; CD14⁺CD16⁻), промежуточными (пМо; CD14⁺CD16⁺) и неклассическими (нМо; CD14⁺CD16⁺⁺) [18]. Указанные субпопуляции характеризуются не только фенотипическими, но и функциональными различиями — профилем/уровнем экспрессируемых цитокинов и хемокиновых рецепторов, способностью к дифференцировке (в макрофаги, дендритные клетки и остеокласты), а также функциональной активностью дифференцированных из моноцитов клеток [9, 16].

Вовлечение моноцитов в патологический процесс подтверждается изменением их субпопуляционной структуры, в частности возрастанием доли CD16⁺-моноцитов, выявленной способностью CD16⁺-моноцитов мигрировать в печень и модулировать процессы воспаления

и фиброгенеза [10], а также ассоциацией CD16⁺-моноцитов с выраженностью печеночных повреждений, прогрессией заболевания и риском летального исхода [3, 4]. Однако исследования в этом направлении немногочисленны и данные о причастности отдельных субпопуляций CD16⁺-моноцитов к прогрессии ЦП неоднозначны. Так, если по данным одних авторов профиброгенная активность характерна для пМо [10, 19], то по данным других свойственна нМо [6, 11]. Противоречивые результаты имеются также в отношении сопряженности CD16⁺-моноцитов с прогрессией заболевания, которая может быть как прямой [11], так и обратной [4].

Следует отметить, что одним из ограничений этих исследований было то, что субпопуляции моноцитов и их клиническая значимость оценивались либо в выборках пациентов со смешанной этиологией ЦП, либо в когортах пациентов с хроническими заболеваниями печени (ХЗП), включающих, наряду с ЦП, больных хроническими гепатитами на различных стадиях фиброза. Соответственно, сведения об изменениях численности и значимости субпопуляций моноцитов при вирусном ЦП, в том числе у пациентов с HCV- и HVB-ассоциированным ЦП до настоящего времени отсутствуют.

Целью настоящего исследования стала сравнительная оценка структуры циркулирующего пула моноцитов у больных ЦП вирусной этиологии и анализ сопряженности между содержанием отдельных субпопуляций моноцитов с выраженностью поражения печени и тяжестью заболевания в сравнении с токсическим и билиарным/аутоиммунным ЦП.

Материалы и методы

Настоящее проспективное когортное исследование проводили в рамках фундаментальных и поисковых научных исследований. Последовательно отбирали пациентов с ЦП вирусной этиологии (обоих полов, в возрасте от 18 до 70 лет), прошедших обследование и лечение на базе отделения иммунологии клиники иммунопатологии НИИФКИ в период с сентября 2018 г. по июнь 2020 г. Диагноз ЦП базировался на результатах гистологического исследования, а также комплекса клинических, лабораторных и радиологических данных у пациентов с явными признаками портальной гипертензии. Гепатит С диагностировали по наличию анти-HCV-антител и HCV-РНК; гепатит В — при выявлении HBsAg; гепатит D — по выявлению HBsAg и анти-HDV-антител; микстинфекция — при одновременном выявлении гепатита С и В или В+D. Критериями исключения являлось одновременное участие в другом клиническом исследовании, несоответствие

критериям включения, активный алкоголизм и/или употребление наркотических средств, ВИЧ-инфекция, декомпенсированные заболевания легких и сердца, кровотечение из варикозно расширенных вен пищевода, наличие гепатоцеллюлярной карциномы или других онкологических заболеваний, острые инфекции, тромбоцитопения ниже $50 \times 10^9/\text{л}$, психические нарушения, беременность, неспособность пациента подписать информированное согласие. Пациенты на момент обследования не получали противовирусной терапии. Степень тяжести ЦП оценивали по шкале Чайлда–Пью и MELD (шкала прогнозирования выживаемости пациентов в листе ожидания на трансплантацию печени). В группы сравнения вошли пациенты с алкогольным ЦП и билиарным/аутоиммунным ЦП. Контрольную группу составили 29 сопоставимых по полу и возрасту доноров крови. Исследования проводились после получения от всех участников письменного информированного согласия и были одобрены решением локального этического комитета НИИФКИ.

Общелабораторные тесты проводили стандартно с использованием сертифицированного оборудования. При поступлении у всех пациентов забирали венозную кровь для иммунологических исследований. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли методом центрифугирования гепаринизированной крови в градиенте плотности фиколла-верографина ($\rho = 1,078$). Лизис эритроцитов при необходимости проводили раствором VersaLyse (Beckman Coulter, Франция) в соответствии с инструкцией. Оценку кМо (CD14⁺⁺CD16⁻), пМо (CD14⁺⁺CD16⁺) и нМо (CD14⁺CD16⁺⁺) проводили по общепринятой методике с использованием PerCP, FITC- и PE-меченых моноклональных анти-HLA-DR, анти-CD14- и анти-CD16-антител, соответственно (BD Pharmingen, США). Комплексное лечение пациентов включало стандартную базисную терапию (с учетом класса ЦП) и внутривенную инфузию аутологичных костномозговых клеток, как описано ранее [15]. Ответ на терапию оценивали через 12 мес. Отсутствие изменений балла Чайлда–Пью (стабилизация) у пациентов с исходно прогрессирующим ЦП или снижение балла по шкале Чайлда–Пью (уменьшение тяжести ЦП) расценивали как наличие клинического ответа, возрастание балла Чайлда–Пью через 12 мес. или летальный исход в течении 12 мес. — как отсутствие ответа.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианных значений (Me) и квартильного диапазона (LQ–UQ, 25–75% квартили). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметри-

ческие критерии: U-критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили с помощью ранговой корреляции Спирмена (Rs). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. ROC-анализ для оценки прогностической значимости потенциальных предикторов ответа проводили с использованием программы GraphPad 5.0.

Результаты

Характеристика пациентов

Исследуемую группу составил 31 пациент с вирусным ЦП в возрасте от 35 до 57 лет (табл. 1). Хронический гепатит С в качестве причины ЦП был диагностирован у 19 пациентов. В этой подгруппе генотип 1b выявлялся у 10 и генотип 3a —

Таблица 1. Характеристика больных ЦП

Table 1. Characteristics of LC patients

Параметры Parameters	Исследуемая группа (вирусный ЦП) Study group (viral LC)	Группы сравнения Comparison groups	
		Алкогольный ЦП Alcoholic LC	Билиарный/ Аутоиммунный ЦП Biliary/Autoimmune LC
Количество пациентов Number of patients	31	7	13
Возраст (Me; min–max), лет Age, years	48 (35–57)	57 (48–62)	55 (44–60)
Пол, М/Ж Sex, M/F	22/9	5/2	1/12
Шкала Чайлда–Пью/Child–Pugh scale (Me; LQ–UQ)	6,0 (6,0–7,0)	7,0 (6,0–8,0)	6,0 (5,0–7,0)
Шкала Чайлда–Пью/Child–Pugh scale A, n (%)	21/31 (67,7%)	3/7 (42,8%)	7/13 (53,8%)
Шкала Чайлда–Пью/Child–Pugh scale B, n (%)	9/31 (29,0%)	3/7 (42,8%)	6/13 (46,2%)
Шкала Чайлда–Пью/Child–Pugh scale C, n (%)	1/31 (3,3%)	1/7 (14,4%)	0/13 (0%)
Шкала Чайлда–Пью/Child–Pugh scale B+C, n (%)	10/31(32,3%)	4/7 (57,2%)	6/13 (46,2%)
MELD (Me; LQ–UQ)	12,0 (9,6–13,3)	13,0 (10,0–16,0)	12,5 (8,6–16,0)

Таблица 2. Характеристика моноцитарного звена у больных ЦП в исследуемой группе, в группах сравнения и у здоровых доноров

Table 2. Monocyte lineage characteristics in LC patients from study group, comparison groups and healthy donors

Группы Groups		n	Лейкоциты Leukocytes	Моноциты Monocytes		ЛМИ LMI
			× 10 ⁹ /l	%	× 10 ⁹ /l	
1	Доноры/Donors	n = 29	6,1 (5,2–7,6)	7,1 (6,5–8,2)	0,35 (0,3–0,4)	4,3 (3,4–5,5)
Вирусный ЦП (Viral LC)						
2	Общая группа Total group	n = 31	4,1(3,3–5,7) p = 0,045	10,4 (8,1–13) p = 0,00001	0,44 (0,32–0,52) p = 0,13	3,8 (2,7–4,7) p = 0,01
3	НСV	n = 17	4,4 (3,7–5,2) p = 0,049	10,7 (8,3–14) p = 0,0009	0,46 (0,34–0,63) p = 0,17	4,1 (2,7–4,9) p = 0,043
4	НВV/HDV	n = 12	4,0 (3,1–5,0) p = 0,006	10,4 (8,1–12) p = 0,0003	0,38 (0,32–0,4) p = 0,76	3,8 (2,9–4,7) p = 0,023
Группы сравнения/Comparison groups						
5	Алкогольный ЦП Alcoholic LC	n = 7	4,7 (3,3–5,7) p = 0,07	12,3 (9,9–16) p = 0,0006	0,50 (0,28–0,76) p = 0,5	2,7 (2,3–4,4) p = 0,02
6	Билиарный/аутоиммунный ЦП Biliary/autoimmune LC	n = 13	4,8 (3,6–6,2) p = 0,02	11,7 (8,8–14) p = 0,009	0,39 (0,31–0,49) p = 0,33	3,9 (2,7–4,4) p = 0,008
P _(3–4)			0,12	0,54	0,16	0,82
P _(2–5)			0,91	0,23	0,48	0,26
P _(2–6)			0,43	0,74	0,79	0,89

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (LQ–UQ). ЛМИ — лимфоцитарно-моноцитарный индекс, P — достоверность различий между донорами и больными, P_(3–4, 2–5, 2–6) — достоверность различий между группами больных ЦП, U-критерий Манна–Уитни.

Note. Data are presented as median (Me) and interquartile range (LQ–UQ). LMI — lymphocyte-monocytic index, P — the significance of differences between donors and patients, P_(3–4, 2–5, 2–6) — the significance of differences between groups of LC patients, Mann–Whitney U-test.

у 7 пациентов. В 2 случаях определить генотип не представлялось возможным. Репликация вируса при HCV-ассоциированном ЦП выявлялась у 4 из 19 пациентов. Хронический гепатит В как причина ЦП был диагностирован у 12 пациентов и в 8 случаях сочетался с гепатитом D. Репликация вируса у больных с HBV/(HDV)-ассоциированным ЦП регистрировалась у 9 из 12 пациентов. Группы сравнения были представлены пациентами с алкогольным ЦП (n = 7), а также билиарным/аутоиммунным ЦП (n = 13), причиной которого у 9 пациентов являлся первичный билиарный цирроз и у 4 — аутоиммунный гепатит. Контрольную группу составили 29 доноров (16 мужчин и 13 женщин) в возрасте от 33 до 65 лет (Me = 47,2).

В соответствии с классификацией ЦП по Чайлду–Пью, класс А в исследуемой группе выявлялся у 21 (67,7%), класс В — у 9 (29,0%) и класс С — у 1 (3,3%) пациента. Таким образом доля больных с декомпенсированным ЦП (В+С) составила 32,3%. В группах сравнения количество пациентов с декомпенсированным ЦП было несколько выше (57,2 и 46,2% при алкогольном и билиарном/аутоиммунном

ЦП соответственно), но эти различия не были статистически значимы. Больные ЦП в сформированных группах были также сопоставимы по медианным значениям балла Чайлда–Пью и MELD. Единственным и вполне ожидаемым различием было превалирование пациентов женского пола среди больных с билиарным/аутоиммунным ЦП.

Моноциты и их субпопуляции у больных вирусным ЦП

Пациенты с вирусным ЦП характеризовались повышенным процентным содержанием моноцитов в периферической крови (табл. 2) в сравнении с контрольной группой доноров и, учитывая лимфопению, сниженным лимфоцитарно-моноцитарным индексом. Эти изменения регистрировались как у больных с HCV-, так и HBV/HDV-инфекцией, а также выявлялись в группах сравнения — при алкогольном и билиарном/аутоиммунном ЦП с наибольшей выраженностью при алкогольном ЦП. Возрастание абсолютного количества моноцитов при вирусном ЦП, как и в группах сравнения, в силу лейкопении не достигало статистической значимости.

Таблица 3. Субпопуляции моноцитов у больных ЦП в исследуемой группе, группах сравнения и здоровых доноров

Table 3. Monocyte subsets in LC patients from study group, comparison groups and healthy donors

Группы Groups		Субпопуляции моноцитов, % Monocyte subsets, %			Соотношение кМо/пМо cMo/iMo ratio	
		кМо cMo	пМо iMo	нМо nMo		
1	Доноры/Donors	n = 22	89 (83–91)	4,0 (3,0–5,0)	2,0 (1,0–3,0)	22 (16–39)
Вирусный ЦП/Viral LC						
2	Общая группа/Total group	n = 31	85 (81–90) p = 0,25	8,0 (5,0–12,0) p = 0,000008	2,5 (2,0–4,0) p = 0,01	10,0 (7,3–18,0) p = 0,00007
3	HCV	n = 17	87 (81–90) p = 0,7	8,0 (5,0–10,0) p = 0,0002	2,4 (2,0–3,0) p = 0,039	11,0 (9,1–19,0) p = 0,0004
4	HBV/HDV	n = 12	84 (82–90) p = 0,16	8,5 (5,1–12,0) p = 0,003	3,5 (1,7–4,0) p = 0,047	9,8 (7,1–17,0) p = 0,004
	P_(3–4)		0,35	0,65	0,63	0,66
5	Репликация (–)/Replication (–)	n = 16	87 (82–90)	8,0 (5,0–11,0)	2,4 (2,0–3,0)	10,0 (7,4–15,0)
6	Репликация (+)/Replication (+)	n = 15	83 (81–86)	7,0 (5,0–10,0)	3,5 (2,0–7,5)	9,7 (6,5–15,0)
	P_(5–6)		0,31	0,48	0,11	0,77
Группы сравнения/Comparison groups						
	Алкогольный ЦП Alcoholic LC	n = 7	85 (84–86) p = 0,14	11,0 (8,0–11) p = 0,00018	3,0 (2,0–5,0) p = 0,045	7,8 (6,4–11,0) p = 0,00013
	Билиарный/аутоиммунный ЦП Biliary/autoimmune LC	n = 13	83 (81–86) p = 0,033	7,0 (5,0–10,0) p = 0,004	4,1 (3,0–6,0) p = 0,0002	12,0 (7,9–18,0) p = 0,004

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (LQ–UQ). кМо, пМо и нМо — классические, промежуточные и неклассические моноциты, соответственно. P — достоверность различий между донорами и больными;

P_(3–4) — достоверность различий между подгруппами с HCV- и HBV/HDV-ассоциированным ЦП; P_(5–6) — достоверность различий между подгруппами с наличием и отсутствием репликации вируса. U-критерий Манна–Уитни.

Note. Data are presented as median (Me) and interquartile range (LQ–UQ). cMo, iMo and nMo are classical, intermediate and non-classical monocytes, respectively. P — the significance of differences between donors and patients; P_(3–4) — the significance of differences between subgroups with HCV- and HBV/HDV-associated LC; P_(5–6) — the significance of differences between subgroups with and without viral replication. Mann–Whitney U-test.

Оценка субпопуляций моноцитов при вирусном ЦП (табл. 3) показала достоверное увеличение доли пМо и нМо, а также тенденцию к снижению относительного содержания кМо и двукратное снижение индекса кМо/пМо. Сравнение пациентов с HCV- и HBV/(HDV)-ассоциированным ЦП не выявило различий: обе подгруппы характеризовались сходными изменениями субпопуляционной структуры моноцитов и индекса кМо/пМо. Увеличение доли пМо и нМо и снижение индекса кМ/пМо не было обусловлено репликацией вируса, поскольку в подгруппах с наличием и отсутствием вирусной репликации содержание и соотношение субпопуляций моноцитов было сопоставимо. Учитывая эти факты, больные с HCV- и HBV/(HDV), независимо от фазы репликации вируса, были объединены в дальнейших исследованиях в общую группу.

Изменения субпопуляционной структуры моноцитов в группах сравнения в целом были сходными. Из особенностей можно отметить более выраженное по сравнению с донорами снижение кМн у пациентов с билиарным/аутоиммунным ЦП ($pU = 0,033$). Кроме того, в сравнении с вирусным ЦП пациенты с алкогольным и билиарным/аутоиммунным ЦП характеризовались более высоким содержанием пМо и нМо соответственно, но эти различия не были статистически значимы.

Сопряженность субпопуляций моноцитов с маркерами печеночных повреждений

Анализ сопряженности субпопуляций моноцитов (табл. 4) с лабораторными индикаторами, отражающими повреждения печеночных клеток (уровень билирубина, ЛДГ, АСТ/АЛТ) и снижение белково-синтезирующей функции печени (альбумин), выявил у больных вирусным ЦП наличие прямой корреляционной связи пМо с концентрацией общего билирубина ($r = 0,48$; $p = 0,011$), индексом АСТ/АЛТ ($r = 0,47$; $p = 0,016$) и уровнем ЛДГ ($r = 0,47$; $p = 0,02$) и выраженной обратной корреляции пМо с уровнем альбумина ($r = -0,57$; $p = 0,002$). В то же время относительное содержание кМо и их отношение с пМо находились в обратной корреляционной зависимости с индексом АСТ/АЛТ.

При алкогольном ЦП таких сопряженностей не наблюдалось, тогда как при билиарном/аутоиммунном ЦП на уровне выраженного тренда доля пМо обратно коррелировала с индексом АСТ/АЛТ ($r = -0,55$; $p = 0,08$), а содержание нМо находилось в прямой взаимосвязи с концентрацией альбумина ($r = 0,52$; $p = 0,09$). Таким образом, прямая сопряженность пМо с повреждением печени и снижением ее белкосинтезирующей функции была характерна для больных вирусным ЦП и не прослеживалась при алкогольном и билиарном/аутоиммунном ЦП.

Таблица 4. Корреляционные связи субпопуляций моноцитов с лабораторными индикаторами поражения печени

Table 4. Correlations between monocyte subsets and laboratory indicators of liver injury

Биохимические маркеры Biochemical markers	Вирусный ЦП Viral LC n = 31	Алкогольный ЦП Alcoholic LC n = 7	Билиарный/аутоиммунный ЦП Biliary/autoimmune LC n = 13
Общий билирубин/Total bilirubin			
кМо/сМо	-0,23 (0,24)	-0,15 (0,47)	0,24 (0,47)
пМо/iМо	0,48 (0,011)	0,03 (0,95)	-0,18 (0,58)
нМо/nМо	0,15 (0,52)	0,15 (0,77)	-0,40 (0,21)
кМо/пМо сМо/iМо	-0,23 (0,025)	-0,15 (0,77)	0,24 (0,47)
АСТ/АЛТ AST/ALT			
кМо/сМо	-0,52 (0,006)	0,39 (0,43)	0,21 (0,52)
пМо/iМо	0,47 (0,016)	-0,09 (0,86)	-0,55 (0,08)
нМо/nМо	0,06 (0,77)	0,45 (0,36)	-0,35 (0,27)
кМо/пМо сМо/iМо	-0,53 (0,049)	0,39 (0,43)	0,20 (0,50)
ЛДГ/LDH			
кМо/сМо	-0,04 (0,82)	0,11 (0,55)	-0,36 (0,27)
пМо/iМо	0,47 (0,02)	-0,3 (0,60)	0,06 (0,87)
нМо/nМо	0,19 (0,36)	-0,3 (0,58)	0,28 (0,39)
кМо/пМо сМо/iМо	-0,04 (0,8)	0,11 (0,85)	-0,36 (0,27)
Альбумин/Albumen			
кМо/сМо	0,13 (0,50)	-0,11 (0,55)	0,07 (0,84)
пМо/iМо	-0,57 (0,002)	0,10 (0,86)	-0,12 (0,51)
нМо/nМо	-0,22 (0,26)	0,11 (0,85)	0,52 (0,09)
кМо/пМо сМо/iМо	0,13 (0,50)	-0,11 (0,85)	0,06 (0,84)

Примечание. Представлены коэффициенты корреляции по Спирмену и их достоверность (в скобках).

Note. The Spearman correlation coefficients and their significance (in brackets) are presented.

Сопряженность циркулирующих моноцитов с тяжестью ЦП

При сравнении пациентов с компенсированным и декомпенсированным вирусным ЦП (табл. 5) более выраженные изменения субпопуляционного состава моноцитов выявлялись у пациентов с большей тяжестью (класс В+С по шкале Чайлда–Пью). Так, достоверное снижение кМо регистрировалось только у больных с классом В+С, тогда как в группе с классом А проявлялось в виде тренда. Кроме того, пациенты с декомпенсированным вирусным ЦП отличались достоверно более высоким содержанием пМо и более низким индексом кМо/пМо.

В группах сравнения таких закономерностей не прослеживались. Напротив, при алкогольном ЦП содержание пМо было более высоким у пациентов с классом А, чем с классом В+С, а при билиарном/аутоиммунном ЦП доля нМо у пациентов с классом А превышала таковую у пациентов с классом В+С, хотя эти различия проявлялись в виде тенденции. Индекс соотношения кМо/пМо при алкогольном и билиарном/аутоиммунном ЦП в подгруппах с компенсированным и декомпенсированным ЦП значимо не различался.

Вовлечение субпопуляций Мо в прогрессию заболевания при вирусном ЦП подтверждалось также наличием прямой корреляции (табл. 6) балла Чайлда–Пью с относительным содержанием пМо ($r_s = 0,57$; $p = 0,001$) и обратной корреляции с долей кМо ($r_s = -0,35$; $p = 0,059$) и индексом кМо/пМо ($r_s = -0,56$; $p = 0,01$). Схожие

результаты получены при анализе корреляций с баллом MELD, который находился в прямой сопряженности с долей пМо ($r_s = 0,41$; $p = 0,033$) и обратной — с индексом кМо/пМо ($r_s = -0,40$; $p = 0,039$). Анализ в группах сравнения показал, что у пациентов с алкогольным ЦП содержание пМо обратно коррелировало с баллом Чайлда–Пью и особенно MELD. Соответственно, между индексом кМо/пМо и баллом MELD выявлялась сильная прямая корреляция ($r_s = 0,94$; $p = 0,002$). Ассоциация кМо с тяжестью по шкале Чайлда–Пью также носила характер отрицательной связи ($r_s = -0,37$; $p = 0,041$). В группе с билиарным/аутоиммунным ЦП тяжесть заболевания обратно коррелировала с относительным содержанием нМо, что проявлялось в виде тренда в отношении балла тяжести по Чайлда–Пью ($p = 0,09$) и сильной достоверной корреляции с баллом MELD ($r_s = -0,76$; $p = 0,006$).

Сопряженность субпопуляций моноцитов с отдаленным ответом на терапию/прогрессией ЦП

Поскольку большинство рекрутированных пациентов после проведения комплексной терапии имели результаты повторного обследования на период 12-месячного наблюдения, одной из задач стала оценка прогностической значимости исследуемых субпопуляций моноцитов в качестве предиктора отдаленного ответа/прогрессии заболевания. Стабилизация или уменьшение тяжести заболевания (снижение балла Чайлда–Пью) через 12 мес. после терапии

Таблица 5. Субпопуляции моноцитов у больных с различной тяжестью ЦП по шкале Чайлда–Пью

Table 5. Monocytes subsets in patients with different severity of LC according to the Child–Pugh scale

Группы Groups	n	Субпопуляции моноцитов, % Monocyte subsets, %			Соотношение кМо/пМо сМо/иМо ratio
		кМо сМо	пМо иМо	нМо пМо	
Доноры/Donors	n = 22	89 (83–91)	4,0 (3,0–5,0)	2,0 (1,0–3,0)	22 (16–39)
Вирусный ЦП/Viral LC					
– class A	n = 21	85 (81–90)	6,0 (5,0–9,0)**	2,5 (2,0–4,0)*	15 (9,3–19)**
– class B+C	n = 10	82 (79–87)*	10 (8,0–13)**	3,0 (2,0–6,0)**	7,9 (6,5–10)**
PU (A vs B+C)		0,67	0,02	0,53	0,02
Алкогольный ЦП/Alcoholic LC					
– class A	n = 3	85 (85–88)	11 (10–18)**	2,0 (2,0–5,0)	7,7 (4,9–8,5)**
– class B+C	n = 4	85 (77–85)	9,5 (7,0–11)**	3,0 (2,5–4,5)*	9,2 (7,1–12)**
PU (A vs B+C)		0,27	0,27	0,45	0,28
Билиарный/аутоиммунный ЦП Biliary/autoimmune LC					
– class A	n = 7	82 (81–88)	6,0 (3,0–8,6)	5,0 (4,1–13)**	14 (9,5–30)
– class B+C	n = 6	84 (79–86)	8,5 (5,0–12)**	3,5 (2,0–4,0)	10 (7,1–17)*
PU (A vs B+C)		0,83	0,34	0,06	0,25

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (LQ–UQ). * ** — $p < 0,05$ и $p < 0,01$ достоверность различий между донорами и больными; PU — достоверность различий между группами Чайлда–Пью класса А и класса В+С, U-критерий Манна–Уитни.

Note. Data are presented as median (Me) and interquartile range (LQ–UQ). * ** — $p < 0,05$ and $p < 0,01$ — the significance of differences between donors and patients; PU — the significance of differences between the groups Child–Pugh class A and class B+C, Mann–Whitney U-test.

Таблица 6. Корреляционные связи субпопуляций моноцитов с тяжестью заболевания больных ЦП

Table 6. Correlations between monocyte subsets and disease severity of LC patients

Группы/маркеры Groups/markers	Вирусный ЦП Viral LC n = 31	Алкогольный ЦП Alcoholic LC n = 7	Билиарный/аутоиммунный ЦП Biliary/autoimmune LC n = 13
Корреляция с баллом Чайлда–Пью/Correlation with the Child–Pugh score			
кМо/сМо	–0,35 (0,059)	–0,37 (0,041)	–0,13 (0,67)
пМо/iМо	0,57 (0,001)	–0,52 (0,20)	0,13 (0,69)
нМо/nМо	0,30 (0,11)	0,13 (0,78)	–0,49 (0,09)
кМо/пМо сМо/iМо	–0,56 (0,01)	0,56 (0,18)	–0,18 (0,56)
Корреляция с баллом MELD/Correlation with the MELD score			
кМо/сМо	–0,24 (0,23)	–0,39 (0,38)	0,16 (0,63)
пМо/iМо	0,41 (0,033)	–0,93 (0,002)	0,028 (0,93)
нМо/nМо	0,05 (0,80)	–0,09 (0,84)	–0,76 (0,006)
кМо/пМо сМо/iМо	–0,40 (0,039)	0,94 (0,0018)	–0,09 (0,79)

Примечание. Представлены коэффициенты корреляции по Спирмену и их достоверность (в скобках).

Note. The Spearman correlation coefficients and their significance (in brackets) are presented.

при вирусном ЦП регистрировались у 21 из 27 больных. Соответственно, нарастание тяжести, свидетельствующее о прогрессии ЦП, было отмечено только у 6 пациентов (22% случаев). В группе с алкогольным ЦП прогрессии заболевания ни у одного из 7 пролеченных пациентов не наблюдалось, а в группе с билиарным/аутоиммунным ЦП выявлялось лишь у одного из 11 пациентов (9% случаев). Таким образом, пациенты с вирусным ЦП менее эффективно отвечали на проводимое комплексное лечение по сравнению с больными из групп сравнения. Прогрессия ЦП вирусной этиологии регистрировалась как у пациентов с компенсированной (n = 3), так и декомпенсированной формой заболевания (n = 3) и не была связана с большей тяжестью больных вирусным ЦП (табл. 1).

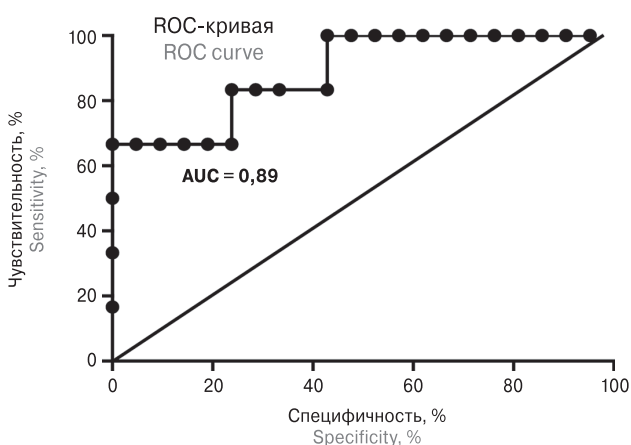


Рисунок. Прогностическая значимость соотношения кМо/пМо в оценке прогрессии вирусного ЦП через 12 мес. после комплексной терапии (ROC-анализ)

Figure. The prognostic significance of the cMo/iMo ratio for evaluating viral LC progression 12 months after complex therapy (ROC analysis)

Сопоставление субпопуляций моноцитов в группах сравнения показало, что пациенты с прогрессией заболевания при обследовании до начала терапии характеризовались тенденцией к меньшему содержанию кМо ($p = 0,059$), достоверно более высоким количеством пМо и двукратно меньшим индексом соотношения кМо/пМо (данные не представлены).

Проведение ROC-анализа показало (табл. 7), что прогностические модели, основанные на оценке кМо, пМо и индекса кМо/пМо у больных вирусным ЦП, характеризовались высокой точностью прогноза при использовании в качестве предикторов прогрессии заболевания, поскольку площадь под кривой превышала 0,75 и была наибольшей для индекса кМо/пМо ($AUC = 0,89$; рис.). При значениях индекса $< 9,5$ прогрессия прогнозировалась с чувствительностью 83,3 и специфичностью 76,2%. Важно отметить, что балл Чайлда–Пью и MELD оказались менее эффективными маркерами в качестве предикторов прогрессии ЦП после комплексной терапии в сравнении с индексом кМо/пМо.

Обсуждение

Способность моноцитов при ХЗП мигрировать из периферической крови в печень и дифференцироваться в различные функциональные типы макрофагов, участвующих в регуляции воспаления, образования фиброзной ткани и ее деградации, а также гетерогенность циркулирующих моноцитов по миграционной, функциональной и дифференцировочной способности свидетельствует о патогенетической [3, 19] и потенциальной прогностической значимости этих клеток в качестве индикаторов воспалительного процесса и прогрессии заболевания [8]. Тем не менее сведения об особенностях моноцитарного паттерна в зависимости от этиологии и тя-

жести ЦП, особенно вирусного генеза, остаются малочисленными и зачастую противоречивыми.

Проведенные нами исследования продемонстрировали возрастание относительного количества моноцитов, в том числе пМо и нМо и снижение кМо у больных вирусными ЦП и показали, что 1) изменения в субпопуляционной структуре циркулирующих моноцитов на стадии ЦП не зависят от типа вирусной инфекции (HCV vs HBV/HDV) и репликации вируса и 2) аналогичные изменения в моноцитарном звене наблюдаются и при других формах ЦП, в частности, алкогольном и билиарном/аутоиммунном ЦП.

Полученные нами результаты в группах сравнения согласуются с данными литературы о повышенном содержании пМо при первичном билиарном циррозе [11] и алкогольном ЦП [4, 10]. Относительно HBV/HDV-ассоциированной инфекции, имеющиеся в литературе данные ограничены сообщением о повышенном содержании пМо при активном течении хронического гепатита В [17], а также возрастании общей популяции CD16⁺-моноцитов в смешанной группе пациентов, включающей больных хроническим гепатитом В и С на стадии фиброза и ЦП [19]. Соответственно, нами впервые продемонстрировано увеличение обеих субпопуляций CD16⁺-моноцитов (пМо и нМо) в изолированной группе пациентов с HBV/HDV-инфекцией на стадии ЦП. Что касается HCV-ассоциированного ЦП, V.L. Gadd и соавт. не выявили увеличения субпопуляций CD16⁺-моноцитов при HCV-ассоциированных ХЗП, что может быть отчасти связано с включением в исследование значительной доли пациентов на стадии фиброза [6]. Наряду с этим, имеются сообщения о повышенном содержании пМо в смешанной группе больных ЦП, включающей около 20% пациентов с ЦП, обусловленным HCV-инфекцией [4]. С этих позиций наши результаты однозначно демонстрируют увеличение промежуточных и неклассических моноцитов у больных с HCV-

ассоциированным ЦП. При этом важным моментом является тот факт, что на стадии ЦП увеличения субпопуляций CD16⁺-моноцитов при HCV- и HBV-инфекции происходит в одинаковой степени и не связано с репликацией вируса.

Возрастание CD16⁺-моноцитов описано при многих хронических заболеваниях, включая сердечно-сосудистую патологию [14]. Тем не менее экспансия этих клеток при вирусных ЦП, по-видимому, не является исключительно следствием коморбидности, поскольку по данным литературы доля CD16⁺-моноцитов коррелирует с концентрацией провоспалительных цитокинов и клинической прогрессией заболевания [19]. Также показано, что CD16⁺-моноциты обладают более высокой (по сравнению с классическими CD14⁺CD16⁻-моноцитами) способностью к трансэндотелиальной миграции [10], секреции цитокинов и хемокинов с провоспалительной и профиброгенной активностью (TNF α , IL-6, CXCL8/IL-8, CXCL1, CCL2, CCL3, CCL5 и IL-13), активации звездчатых клеток и Th1-ответа [10, 11, 19]. Тем не менее и в этом аспекте данные достаточно противоречивы и включают сообщения о прямой сопряженности CD16⁺-моноцитов с прогрессией заболевания [11, 17, 19], обратной зависимости [4, 12] и отсутствии таковой [6].

Полученные нами данные косвенно свидетельствуют о разнонаправленных эффектах кМо и пМо при вирусном ЦП, в частности о негативном эффекте пМо и протективном кМо. Характерно, что прямая сопряженность пМо с маркерами повреждения/недостаточности печеночных клеток и тяжестью ЦП была характерна для вирусного ЦП и не выявлялась в группах сравнения. Напротив, при алкогольном ЦП тяжесть заболевания обратно коррелирует с содержанием пМо, а при билиарном/аутоиммунном ЦП — с долей нМо, свидетельствуя в пользу протективной активности субпопуляций CD16⁺-моноцитов.

Таблица 7. Прогностическая значимость субпопуляций моноцитов, соотношения кМо/пМо, шкал Чайлда–Пью и MELD в качестве предикторов отдаленного ответа/прогрессии вирусного ЦП

Table 7. Comparative characteristics of the prognostic significance of monocyte subsets, cMo/iMo ratio, Child–Pugh and MELD scores as a predictor for long-term response/progression of viral LC

Параметры Parameters	AUC (P value)	95% доверительный интервал Confidence interval	Пороговое значение Threshold value	SN/SP, %	Отношение правдоподобия Likelihood ratio
кМо/сМо	0,76 (0,054)	0,57–0,95	< 84,5%	83/62	2,19
пМо/iМо	0,82 (0,016)	0,65–0,99	> 8,5%	67/71,4	2,33
кМо/пМо сМо/iМо	0,89 (0,004)	0,74–1,04	< 9,5	83,3/76,2	3,50
Балл Чайлда–Пью Child–Pugh score	0,74 (0,080)	0,51–0,97	> 6,5	50/70	1,67
Балл MELD MELD score	0,78 (0,040)	0,59–0,98	> 12,9	83/66	2,50

Примечание. AUC — площадь под кривой, SN/SP — чувствительность/специфичность.

Note. AUC — area under curve, SN/SP — sensitivity/specificity.

Выявление разными авторами как прямой, так и обратной сопряженности пМо или нМо с тяжестью/клинической прогрессией заболевания позволяет предполагать, что функциональная активность этих субпопуляций может существенно различаться в зависимости от стадии заболевания и этиологического фактора. Так, на начальных стадиях ХЗП моноциты характеризуются признаками активации и высокой провоспалительной активности, тогда как на более продвинутых и, особенно, декомпенсированных стадиях ЦП проявляют противовоспалительные свойства, ассоциированные с усилением экспрессии MERTK и снижением экспрессии HLA-DR, продукции активных метаболитов кислорода и провоспалительных цитокинов, что, в конечном счете, обуславливает потерю способности к защите от инфекции [3, 13]. В нашем исследовании пациенты с вирусным ЦП не отличались от больных групп сравнения (алкогольный и билиарный/аутоиммунный ЦП) по медианным значениям балла Чайлда–Пью или MELD. Тем не менее прямая сопряженность пМо с тяжестью при вирусном ЦП ассоциировалась с меньшей долей пациентов с декомпенсированным ЦП, чем при алкогольном ЦП (32 против 57%), при котором пМо находились в обратной зависимости с баллом тяжести. Полученные результаты также не исключают вклад самой вирусной инфекции в детерминирование функциональной активности отдельных субпопуляций моноцитов и их сопряженность с тяжестью заболевания. В настоящей работе мы не оценивали функциональный фенотип моноцитов. Это, с одной стороны, является серьезным ограничением, с другой — определяет направление будущих исследований.

Одним из важных этапов работы стала попытка оценить прогностическую значимость субпопуляций моноцитов в качестве предиктора прогрессии вирусного ЦП через 12 мес. после комплексного лечения. Как выяснилось, пациенты с прогрессией вирусного ЦП исходно (до проведения терапии) по субпопуляционной структуре моноцитов отличались от больных со стабильным течением/снижением тяжести.

Соответственно, по результатам ROC-анализа, прогностические модели, основанные на определении субпопуляций моноцитов и их соотношения, характеризовались «хорошим» (для кМо) и «очень хорошим» (для пМо и, особенно, для индекса кМо/пМо) качеством при прогнозировании риска прогрессии заболевания.

Необходимость прогностических моделей при ЦП традиционно связывают с оптимизацией алгоритма ведения пациентов в листе ожидания трансплантации печени. Основными инструментами прогнозирования для этих целей являются мультифакториальные шкалы оценки тяжести — шкала Чайлда–Пью и MELD. Однако данные шкалы предназначены в большей степени для оценки риска летального исхода и характеризуются недостаточной эффективностью при индивидуальном прогнозе характера течения заболевания [1, 5]. В литературе также имеются сообщения о связи моноцитов и их функций с риском летального исхода [4, 6]. Более того, С.С. Cardoso и соавт. продемонстрировали прогностическую значимость кМо и пМо в отношении риска 3-месячной летальности у пациентов с декомпенсированным ЦП в смешанной выборке с преобладанием алкогольного ЦП [4]. В нашей выборке более половины пациентов имели компенсированную стадию ЦП (класс А), а пациенты с декомпенсированным ЦП были представлены преимущественно больными с классом В. Соответственно, нами впервые 1) продемонстрирована возможность прогноза прогрессии на более ранних стадиях ЦП, 2) показана возможность такого прогноза у пациентов с вирусным ЦП, и 3) в качестве оптимального предиктора прогрессии идентифицирован индекс соотношения кМо/пМо.

В целом полученные результаты свидетельствуют, что, в отличие от пациентов с алкогольным и билиарным/аутоиммунным ЦП, у пациентов с вирусным ЦП возрастание пМо ассоциировано с выраженностью повреждений печени и тяжестью заболевания, что обосновывает необходимость дифференцированного подхода к разработке прогностических моделей и иммунотерапевтических стратегий при вирусных ЦП.

Список литературы/References

1. Лурье Ю.Э., Метелин А.В., Кузнецова А.Е. Современные прогностические модели выживаемости пациентов с терминальными стадиями заболеваний печени // Клиническая и экспериментальная хирургия. 2014. № 2. С. 48–58. [Lurye Yu.E., Metelin A.V., Kuznetsova A.E. Modern predictive models of survival of patients with end-stages liver diseases. *Klinicheskaja i eksperimental'naya khirurgiya = Clinical and Experimental Surgery (Russia)*, 2014, no. 2, pp. 48–58. (In Russ.)]
2. Albillos A., Lario M., Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J. Hepatol.*, 2014, vol. 61, no. 6, pp. 1385–1396. doi: 10.1016/j.jhep.2014.08.010
3. Bernsmeier C., van der Merwe S., Perianin A. Innate immune cells in cirrhosis. *J. Hepatol.*, 2020, vol. 73, no. 1, pp. 186–201. doi: 10.1016/j.jhep.2020.03.027
4. Cardoso C.C., Mاتيollo C., Pereira C.H.J., Fonseca J.S., Alves H.E.L., da Silva O.M., Menegassi V.S., Dos Santos C.R., Moraes A.C.R., Schiavon L.L., Santos-Silva M.C. Patterns of dendritic cell and monocyte subsets are associated with disease severity and mortality in liver cirrhosis patients. *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11, no. 1: 5923. doi: 10.1038/s41598-021-85148-y
5. Cholongitas E., Marelli L., Shusang V., Senzolo M., Rolles K., Patch D., Burroughs A.K. A systematic review of the performance of the model for end-stage liver disease (MELD) in the setting of liver transplantation. *Liver Transpl.*, 2006, vol. 12, no. 7, pp. 1049–1061. doi: 10.1002/lt.20824

6. Gadd V.L., Patel P.J., Jose S., Horsfall L., Powell E.E., Irvine K.M. Altered peripheral blood monocyte phenotype and function in chronic liver disease: implications for hepatic recruitment and systemic inflammation. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 6: e0157771. doi: 10.1371/journal.pone.0157771
7. GBD 2017 Cirrhosis Collaborators. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.*, 2020, vol. 5, no. 3, pp. 245–266. doi: 10.1016/S2468-1253(19)30349-8
8. Irvine K.M., Ratnasekera L., Powell E.E., Hume D.A. Causes and consequences of innate immune dysfunction in cirrhosis. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 10: 293. doi: 10.3389/fimmu.2019.00293
9. Jakubzick C.V., Randolph G.J., Henson P.M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, vol. 17, no. 6, pp. 349–362. doi: 10.1038/nri.2017.28
10. Liaskou E., Zimmermann H.W., Li K.K., Oo Y.H., Suresh S., Stamataki Z., Qureshi O., Lalor P.F., Shaw J., Syn W.K., Curbishley S.M., Adams D.H. Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. *Hepatology*, 2013, vol. 57, no. 1, pp. 385–398. doi: 10.1002/hep.26016
11. Peng A., Ke P., Zhao R., Lu X., Zhang C., Huang X., Tian G., Huang J., Wang J., Invernizzi P., Chen Q., Zhuang J. Elevated circulating CD14^{low}CD16⁺ monocyte subset in primary biliary cirrhosis correlates with liver injury and promotes Th1 polarization. *Clin. Exp. Med.*, 2016, vol. 16, no. 4, pp. 511–521. doi: 10.1007/s10238-015-0381-2
12. Rasmussen E.B., Eriksen L.L., Greisen S.R., Hansen A.L., Carstensen M., Sandahl T.D., Stoy S., Kragstrup T.W. Diminished non-classical monocytes in the blood associate with disease severity in alcoholic hepatitis. *Clin. Exp. Gastroenterol.*, 2021, vol. 14, pp. 259–267. doi: 10.2147/CEG.S299775
13. Riva A., Mehta G. Regulation of monocyte-macrophage responses in cirrhosis — role of innate immune programming and checkpoint receptors. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 10: 167. doi: 10.3389/fimmu.2019.00167
14. Rogacev K.S., Cremers B., Zawada A.M., Seiler S., Binder N., Ege P., Grobe-Dunker G., Heisel I., Hornof F., Jeken J., Rebling N.M., Ulrich C., Schelle B., Bohm M., Fliser D., Heine G.H. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2012, vol. 60, no. 16, pp. 1512–1520. doi: 10.1016/j.jacc.2012.07.019
15. Shevela E.Y., Starostina N.M., Pal'tsev A.I., Shipunov M.V., Zheltova O.I., Meledina I.V., Khvan L.A., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kozlov V.A. Efficiency of cell therapy in liver cirrhosis. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2016, vol. 160, no. 4, pp. 542–547. doi: 10.1007/s10517-016-3215-7
16. Wong K.L., Tai J.J., Wong W.C., Han H., Sem X., Yeap W.H., Kourilsky P., Wong S.-C. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 5, pp. 16–31. doi: 10.1182/blood-2010-12-326355
17. Zhang J.-Y., Zou Z.-S., Huang A., Zhang Z., Fu J.-L., Xu X.-S., Chen L.-M., Li B.-S., Wang F.-S. Hyper-activated pro-inflammatory CD16 monocytes correlate with the severity of liver injury and fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 3: e17484. doi: 10.1371/journal.pone.0017484
18. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J.M., Liu Y.-J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 16, pp. 74–80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558
19. Zimmermann H.W., Seidler S., Nattermann J., Gassler N., Hellerbrand C., Zerneck A., Tischendorf J.J.W., Luedde T., Weiskirchen R., Trautwein C., Tacke F. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14⁺CD16⁺ monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 6: e11049. doi: 10.1371/journal.pone.0011049

Авторы:

Леплина О.Ю., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Тихонова М.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Меледина И.В., к.м.н., зав. отделением иммунологии клиники иммунопатологии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Желтова О.И., к.м.н., врач-иммунолог отделения иммунологии клиники иммунопатологии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Шевела Е.Я., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Останин А.А., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Черных Е.Р., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия.

Authors:

Leplina O.Yu., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Tikhonova M.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Meledina I.V., PhD (Medicine), Head of the Immunology Department, Clinics of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Zheltova O.I., PhD (Medicine), Immunologist, Immunology Department, Clinics of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Shevela E.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ИММУННЫЕ КОМПЛЕКСЫ КАК БИОМАРКЕРЫ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Э.В. Лесник¹, С.С. Гинда²

¹ Государственный медицинский и фармацевтический университет имени Николае Тестемицану, Кишинев, Республика Молдова

² Институт физиопульмонологии им. Кирилла Драганюка, Кишинев, Республика Молдова

Резюме. Целью исследования было определение концентрации циркулирующих иммунных комплексов с высокой (ЦИК 2,5%), средней (ЦИК 4,2%) и низкой (ЦИК 8%) молекулярной массой у больных туберкулезом легких как биомаркеров эндогенной интоксикации и степени ее тяжести. Были обследованы 56 больных с диагнозом «туберкулез легких» и 36 здоровых лиц (контрольная группа). Пациенты были разделены на 2 исследуемые группы. В I группу вошли 29 пациентов, у которых тест выявил лекарственную чувствительность, и во II группу вошли 27 пациентов с подтвержденной множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ). Критерии включения в исследуемые группы: впервые в жизни установленный диагноз туберкулеза легких, возраст от 18 лет, подтвержденная лекарственная чувствительность (I группа) или подтвержденный МЛУ-ТБ (II группа). Критерии исключения: противотуберкулезное лечение в анамнезе, внелегочный туберкулез, возраст до 18 лет, ВИЧ-инфекция и тяжелые соматические заболевания. Метод определения ЦИК состоит в том, что распределяют по 50 мкл сыворотки больного в три пробирки, куда добавляют по 100 мкл боратного буфера и раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ) 2,5, 4,2 и 8,0%, а в четвертую, контрольную, пробирку вводят 50 мкл сыворотки и 100 мкл боратного буфера. Пробирки инкубируют 15 мин и определяют оптическую плотность при длине волны 340 нм. Результаты сопоставляют с общим анализом крови и лейкоцитарным индексом интоксикации Кальф-Калифа как альтернативным методом определения эндогенной интоксикации. В результате исследования были получены следующие данные: более значительные концентрации ЦИК с высокой и средней молекулярной массой и менее значительные концентрации ЦИК с низкой молекулярной массой; преобладание высокого уровня эндогенной интоксикации во II группе и среднего уровня эндогенной интоксикации в I группе, без достижения статистического порога; более низкий по сравнению с контрольным значением у здоровых людей индекс лейкоцитарной интоксикации, рассчитанный по формуле Кальфа-Калифа, вследствие увеличенного количества эозинофилов.

Ключевые слова: туберкулез, эндогенная интоксикация, циркулирующие иммунные комплексы.

Адрес для переписки:

Лесник Эвелина Васильевна
MD-2004, Республика Молдова, Кишинев, ул. Штефана
Великого, 165, Государственный медицинский
и фармацевтический университет им. Николае Тестемицану.
Тел.: +373 698-833-02.
E-mail: evelinalesnic@yahoo.com

Contacts:

Evelina V. Lesnic
MD-2004, Republic of Moldova, Chisinau, Stefan cel Mare str., 165,
Nicolae Testemitsanu State University of Medicine and Pharmacy.
Phone: +373 698-833-02.
E-mail: evelinalesnic@yahoo.com

Для цитирования:

Лесник Э.В., Гинда С.С. Циркулирующие иммунные комплексы как биомаркеры эндогенной интоксикации при туберкулезе легких // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 486–494. doi: 10.15789/2220-7619-TCI-1790

Citation:

Lesnic E.V., Ghinda S.S. The circulating immune complexes as a biomarker of the endogenous intoxication in pulmonary tuberculosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 486–494. doi: 10.15789/2220-7619-TCI-1790

THE CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES AS A BIOMARKER OF THE ENDOGENOUS INTOXICATION IN PULMONARY TUBERCULOSIS

Lesnic E.V.^a, Ghinda S.S.^b

^a Nicolae Testemitsanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova

^b Chiril Draganiuc Institute of Phthiopneumology, Chisinau, Republic of Moldova

Abstract. The aim of the study was to establish the concentration of the circulating immune complexes (CICs) with high (CIC 2,5%), medium (CIC 4,2%) and low (CIC 8,0%) molecular weights in patients with pulmonary tuberculosis (TB) as biomarkers of the endogenous intoxication and the degree of severity. We investigated 56 patients diagnosed with pulmonary TB and 36 healthy persons (control group). The patients were assigned to 2 groups: the study group 1 (I SG) included 29 patients in which the test established the drug susceptible TB and in the study group 2 (II SG) that included 27 patients with multidrug-resistant TB (MDR-TB). The inclusion criteria were: primary detected pulmonary TB, age older than 18 years, confirmed drug susceptibility (I SG) and confirmed MDR-TB (II SG). The exclusion criteria were: anti-TB treatment in anamnesis, extrapulmonary TB, age below 18 years, HIV infection, severe somatic diseases. The method of CIC quantification consisted in placing 50 µl serum into 3 tubes followed by adding 100 µl borate buffer and solution of 2.5%, 4.2% and 8.0% polyethylene glycol. The tubes were incubated 15 minutes at 25°C and the optical density was assessed at the wavelength 340 nm. The results were compared with the general blood count and leucocital intoxication index Kalf-Kalif (LII_{KK}) as an alternative method to identify endogenous intoxication. As the results of the research we established that the peak level was observed for CICs with high and medium molecular weight, whereas less pronounced it was for CICs with low molecular weight. The high severity of the endogenous intoxication predominated in the I SG and middle degree in the IISG, without achieving the statistical significance. LII_{KK} was lower in study groups comparing with the control healthy subjects due to increased count of eosinophils.

Key words: tuberculosis, endogenous intoxication, circulating immune complexes.

Эндогенная интоксикация (ЭИ) развивается вследствие нарушений в механизме детоксикации, который отвечает за удаление эндотоксинов и экзотоксинов путем трансформации или выведения [1, 2, 3]. Основными детерминантами ЭИ являются: оксидативный стресс, снижение биотрансформации токсинов в печени, уменьшение выведения токсинов почками, интоксикация лекарствами, тяжелыми металлами, природными/промышленными ксенобиотиками или генетические нарушения [3, 4]. Иммунные комплексы (ИК) представляют собой молекулы, образованные в результате связывания микробных антигенов с антителами [5]. Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) выявляются в кровотоке в небольших количествах и следуют за неполным разрушением ИК в острой фазе инфекций (вирусных, бактериальных), аллергических и аутоиммунных заболеваний, а также при злокачественных новообразованиях [6]. Высокий уровень ЦИК обнаруживается при различных системных заболеваниях, таких как васкулит, иммунный комплексный гломерулонефрит, красная волчанка, ревматоидный артрит, а также при туберкулезе [5, 6, 7, 8]. Высокий уровень ЦИК не специфичен для какого-либо заболевания, но отражает клиническую картину и помогает определить степень ЭИ [1]. При выраженной ЭИ необходимо проводить длительную детоксикационную терапию, включающую гемосорбцию, энтеросорбцию и иммуномодулирующую терапию [9]. Ранняя диагностика и начало противотуберкулезного лечения

в соответствии с лекарственной устойчивостью и иммуномодуляторные препараты дает пациенту более высокие шансы на выздоровление [1, 2, 5]. Исследования показали, что клинические проявления и радиологические изменения более нарушены, а эффективность лечения намного ниже у пациентов с МЛУ-ТБ [11, 12]. Клинические проявления туберкулеза неспецифичны, и наиболее частые жалобы относятся к синдрому интоксикации: астения, анорексия, лихорадка, похудание и кахексия, ночное потоотделение. Из респираторных симптомов наиболее частыми являются кашель с мокротой и кровохаркание [10].

Целью исследования было определение концентрации циркулирующих иммунных комплексов с высокой (ЦИК 2,5%), средней (ЦИК 4,2%) и низкой (ЦИК 8%) молекулярной массой у больных туберкулезом легких как биомаркеров эндогенной интоксикации (ЭИ).

Материалы и методы

Были обследованы 56 больных с диагнозом «туберкулез легких» и 36 здоровых лиц (контрольная группа). Пациенты были разделены на 2 исследуемые группы. В I группу вошли 29 пациентов, у которых тест выявил лекарственную чувствительность, во II группу — 27 пациентов с подтвержденной множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ). Критерии включения в исследуемые группы: впервые в жизни установленный диагноз туберкулеза легких, инфильтративный тубер-

кулез легких в фазе распада, возраст от 18 лет, подтвержденная лекарственная чувствительность (I группа) или подтвержденный МЛУ-ТБ (II группа). Критерии исключения: противотуберкулезное лечение в анамнезе, внелегочный туберкулез, возраст до 18 лет, ВИЧ-инфекция и тяжелые соматические заболевания. Метод определения ЦИК описан в патенте [6].

По результатам общего анализа крови была проведена оценка лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ_{кк}) по формуле Кальф-Калифа [12]. ЛИИ_{кк} является альтернативным методом определения ЭИ и рассчитывается по формуле:

$$\text{ЛИИ}_{\text{кк}} = \frac{(4\text{МИЕ} + 3\text{Ю}2\text{П} + 1\text{С}) \times (\text{ПК} + 1)}{(\text{М} + \text{Л}) \times (\text{Э} + 1)},$$

где: МИЕ — миелоциты, Ю — юные, П — палочкоядерные, С — сегментоядерные нейтрофилы, ПК — плазматические клетки, М — моноциты, Л — лимфоциты, Э — эозинофилы.

Статистический анализ проводился с использованием программы EpiInfo. Данные оценивались как номинальные или количественные. Частота и процент были указаны для номинальных данных, а среднее и стандартное отклонение были представлены для непрерывных данных. Для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню какого-либо признака, измеряемого количественно, использовался статический U-критерий Манна-Уитни. Статистическая значимость результатов выражалась в виде p и результаты считались значимыми при $p < 0,05$. Для выявления силы и направления корреляционной связи между двумя варьирующими признаками нами был проведен корреляционный анализ и определен коэффициент корреляции (r) Пирсона. Сила корреляционной связи оценивалась следующим образом: при r от +0,3 до +0,49 — как слабая; при r от +0,5 и +0,69 — как умеренная средняя; при r от +0,7 и выше — как сильная.

Исследование было одобрено комитетом по биоэтике Государственного медицинского и фармацевтического университета им. Николае Тестемицану 21.11.2017.

Результаты

При распределении пациентов по биологическим характеристикам было установлено статистическое преобладание мужчин во всех группах, что позволило сопоставить результаты. Их распределение по возрасту выявило, что во всех группах преобладали молодые пациенты в возрасте от 18 до 44 лет. Средний возраст пациентов в контрольной группе составил 36 ± 5 лет, в I группе — 39 ± 6 лет, во II группе —

35 ± 8 лет. Таким образом, по распределению пациентов по полу и возрасту все группы были сопоставимы (табл. 1).

При обследовании у всех пациентов исследуемых групп были выявлены такие клинические симптомы, как астения, похудание и кашель с мокротой. Среди клинических проявлений интоксикационного синдрома преобладали анорексия или потеря аппетита, высокая температура или субфебрильная температура и дефицит массы тела (индекс массы тела $< 19 \text{ кг/м}^2$) во II группе, без достижения статистического порога. Среди клинических проявлений респираторного синдрома незначительно преобладали боль в груди, кровохарканье и одышка во II группе (рис. 1).

Чтобы проанализировать лабораторные данные ЭИ у пациентов с легочным туберкулезом, мы определили концентрацию ЦИК с высокой, средней и низкой молекулярной массой. Концентрация ЦИК с высокой молекулярной массой (ПЭГ 2,5%), которые проявляют низкую степень токсичности, была статистически выше во всех исследуемых группах по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$). При сравнении исследуемых групп между собой, концентрация ЦИК в I группе была статистически ниже, чем во II группе ($p < 0,001$).

Концентрация ЦИК со средней молекулярной массой (ПЭГ 4,2%), которые проявляют среднюю степень токсичности, была статистически выше во всех исследуемых группах по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$). При сравнении исследуемых групп между собой, концентрация в I группе была статистически ниже, чем во II группе ($t = 2,42, p < 0,05$). Концентрация ЦИК с низкой молекулярной массой (ПЭГ 8,0%), которые проявляют высокую степень токсичности, была статистически выше во всех исследуемых группах по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$). При сравнении исследуемых групп между ними, концентрация в I группе была статистически ниже, чем во II группе ($p < 0,001$). Результаты показали, что концентрация всех типов ЦИК выше при лекарственно-устойчивом туберкулезе, чем при лекарственно-чувствительном (табл. 2).

По результатам общего анализа крови была проведена оценка лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ_{кк}) по формуле Кальф-Калифа. ЛИИ_{кк} у пациентов всех групп исследования был ниже, чем у здоровых лиц. У пациентов из 1-й и 2-й групп ЛИИ_{кк} был статистически ниже по сравнению с КГ ($p < 0,001$). Полученные результаты являются следствием повышенного количества эозинофилов (табл. 2).

Чтобы определить корреляцию между концентрациями ЦИК с разной молекулярной

Таблица 1. Распределение пациентов по возрасту и полу

Table 1. Distribution of patients by age and gender

Параметры Parameters	Контрольная группа Control group n = 36	I группа Group 1 n = 29	II группа Group 2 n = 27
	n (%)	n (%)	n (%)
Мужчины/Males	24 (67)*	22 (76)*	18 (67)*
Женщины/Females	12 (33)	7 (24)	9 (33)
18–44 лет/18–44 years old	29 (67)	18 (75)	21 (77)
≥ 45 лет/≥ 45 years old	7 (23)	11 (25)	6 (23)

Примечание. Применяемый статистический тест: парный t-критерий Стьюдента. *Абсолютные числа и проценты в столбце (в скобках).
Notes. The data were compared by using a paired Student's t-test. *Absolute numbers and percentage are shown in columns (in parenthesis).

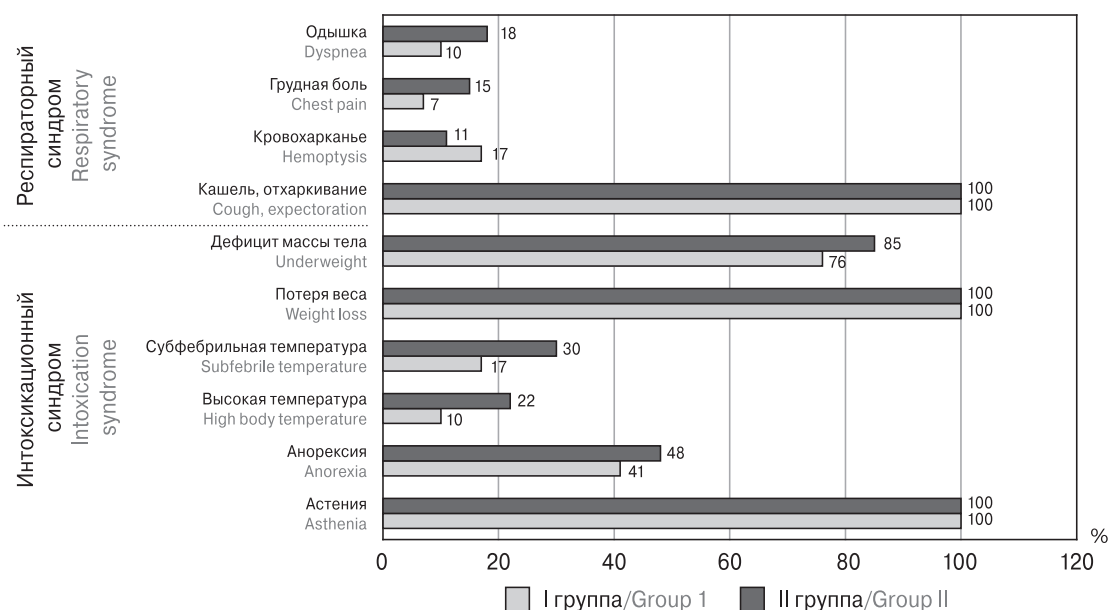
**Рисунок 1. Распределение пациентов по клиническим признакам**

Figure 1. Patient distribution by clinical signs

Таблица 2. Результаты оценки эндогенной интоксикации

Table 2. The data on assessing endogenous intoxication

Параметры Parameters	Контрольная группа Control group n = 36	I группа Group 1 n = 29	II группа Group 2 n = 27
	M±SD	M±SD	M±SD
ЦИК 2,5%* CICs 2.5%*	7,2±0,35 100%	28,2±3,77□ 400%	47,0±6,56● 670%
ЦИК 4,2%* CICs 4.2%*	25,2±0,84 100%	62,6±5,55□ 250%	78,3±9,38● 300%
ЦИК 8,0%* CICs 8.0%*	245,5±7,2 100%	487±39,1□ 200%	523±83,7□ 210%
ЛИИ _{кк} LII _{кк}	0,95±0,043 100%	0,81±0,120 85%	0,68±0,100 70%
Эозинофилы, % Eosinophils, %	1,8±0,10 100%	3,4±0,53□ 190%	2,6±0,77 140%

Примечания. * — применяемый статистический тест: U-критерий Манна-Уитни; □ — статистическая разница между здоровыми людьми и исследуемыми группами; ● — статистическая разница между I группой по сравнению со II группой. Информация была представлена в процентах для определения, во сколько раз концентрация ЦИК и другие результаты изменились у пациентов из I и II групп в сравнении с исходной величиной контрольной группы.

Notes. * — the data were compared by using Mann-Whitney U test; □ — statistical difference between healthy subjects and study groups; ● — statistical difference between group 1 vs group 2. The data are shown as percentage for calculating CIC-fold difference and changes in other parameters in group 1 and group 2 vs baseline magnitude in control group. LII_{кк} — eucocital intoxication index Kalf-Kalif.

Таблица 3. Результат оценки силы корреляции ЦИК
 Table 3. The data on assessing CIC-linked correlation strength

Клинические проявления, дни Clinical manifestations, days	Исследуемые факторы Parameters	r* I группа Group 1	r* II группа Group 2
Астения Asthenia 61±10 ^I 76±184 ^{II}	ЦИК 2,5% (низкая токсичность) CIC 2.5% (low toxicity)	0,5743	0,6733
	ЦИК 4,2% (средняя токсичность) CIC 4.2% (medium toxicity)	0,6213	0,7814
	ЦИК 8,0% (высокая токсичность) CIC 8.0% (high toxicity)	0,7224	0,8014
Потеря аппетита Loss of appetite 38±10 ^I 41±11 ^{II}	ЦИК 2,5% (низкая токсичность) CIC 2.5% (low toxicity)	0,2271	0,3822
	ЦИК 4,2% (средняя токсичность) CIC 4.2% (medium toxicity)	0,3842	0,4212
	ЦИК 8,0% (высокая токсичность) CIC 8.0% (high toxicity)	0,5123	0,5623
Высокая температура High body temperature 7±6 ^I 12±4 ^{II}	ЦИК 2,5% (низкая токсичность) CIC 2.5% (low toxicity)	0,4862	0,4972
	ЦИК 4,2% (средняя токсичность) CIC 4.2% (medium toxicity)	0,4972	0,5843
	ЦИК 8,0% (высокая токсичность) CIC 8.0% (high toxicity)	0,5163	0,6923
Субфебрильная температура Subfebrile temperature 24±6 ^I 21±8 ^{II}	ЦИК 2,5% (низкая токсичность) CIC 2.5% (low toxicity)	0,3832	0,4822
	ЦИК 4,2% (средняя токсичность) CIC 4.2% (medium toxicity)	0,4872	0,5273
	ЦИК 8,0% (высокая токсичность) CIC 8.0% (high toxicity)	0,6913	0,6783
Дефицит массы тела Weight deficit 67±8 [*] 58±12 ^{II}	ЦИК 2,5% (низкая токсичность) CIC 2.5% (low toxicity)	0,4012	0,3912
	ЦИК 4,2% (средняя токсичность) CIC 4.2% (medium toxicity)	0,5482	0,4412
	ЦИК 8,0% (высокая токсичность) CIC 8.0% (high toxicity)	0,6073	0,5273
Потеря веса Weight loss 62±8 ^I 71±16 ^{II}	ЦИК 2,5% (низкая токсичность) CIC 2.5% (low toxicity)	0,4282	0,4022
	ЦИК 4,2% (средняя токсичность) CIC 4.2% (medium toxicity)	0,5353	0,4642
	ЦИК 8,0% (высокая токсичность) CIC 8.0% (high toxicity)	0,7353	0,6123
Кашель с отхаркиванием Cough with expectoration 52±15 ^I 61±8 ^{II}	ЦИК 2,5% (низкая токсичность) CIC 2.5% (low toxicity)	0,3932	0,3032
	ЦИК 4,2% (средняя токсичность) CIC 4.2% (medium toxicity)	0,5043	0,4452
	ЦИК 8,0% (высокая токсичность) CIC 8.0% (high toxicity)	0,6623	0,5563
Кровохарканье Hemoptysis 12±6 ^I 17±4 ^{II}	ЦИК 2,5% (низкая токсичность) CIC 2.5% (low toxicity)	0,2271	0,1281
	ЦИК 4,2% (средняя токсичность) CIC 4.2% (medium toxicity)	0,3122	0,2511
	ЦИК 8,0% (высокая токсичность) CIC 8.0% (high toxicity)	0,3432	0,3712

Клинические проявления, дни Clinical manifestations, days	Исследуемые факторы Parameters	r^*	
		I группа Group 1	II группа Group 2
Боль в груди Chest pain 7±4 ^I 9±3 ^{II}	ЦИК 2,5% (низкая токсичность) CIC 2.5% (low toxicity)	0,1431	0,1311
	ЦИК 4,2% (средняя токсичность) CIC 4.2% (medium toxicity)	0,3152	0,2181
	ЦИК 8,0% (высокая токсичность) CIC 8.0% (high toxicity)	0,3432	0,2881
Одышка Dyspnea 31±7 ^I 42±5 ^{II}	ЦИК 2,5% (низкая токсичность) CIC 2.5% (low toxicity)	0,1181	0,1151
	ЦИК 4,2% (средняя токсичность) CIC 4.2% (medium toxicity)	0,2251	0,2141
	ЦИК 8,0% (высокая токсичность) CIC 8.0% (high toxicity)	0,3672	0,3272

Примечание. ^I — продолжительность клинических проявлений в днях в I группе; ^{II} — продолжительность клинических проявлений в днях во II группе. *Коэффициент корреляции Спирмена был определен для выявления силы корреляции между длительностью клинических признаков и концентрации ЦИК. Интерпретация по шкале Чеддока: 1 при r 0,1–0,29 — очень слабая корреляция, 2 при r 0,3–0,49 — слабая корреляция; 3 при r 0,5–0,69 — средняя корреляция; 4 при r 0,7 и выше — сильная корреляция.

Notes. ^I — duration of clinical manifestations (days) in group 1; ^{II} — duration of clinical manifestations (days) in group 2. *Spearman's correlation coefficient calculated to assess a correlation strength between duration of clinical manifestations and serum CIC level by using Chaddock scale: 1 at r 0,1–0,29 — very weak correlation, 2 at r 0,3–0,49 — weak correlation; 3 at r 0,5–0,69 — medium correlation; 4 at r ≥ 0,7 — strong correlation.

массой между группами, мы использовали коэффициент корреляции Пирсона (R). В I группе была получена сильная положительная корреляция ЦИК 2,5% с ЦИК 4,2% — $R = 0,76$ и $p < 0,0001$; умеренная положительная корреляция ЦИК 2,5% с ЦИК 8% — $R = 0,69$ и $p < 0,01$; умеренная положительная корреляция ЦИК 4,2% и ЦИК 8% — $R = 0,56$ и $p < 0,05$. Таким образом, мы определили сильную положительную корреляцию ЦИК с высокой и средней молекулярной массой в I группе. Кроме того, умеренная корреляция была получена при анализе ассоциации ЦИК со средней и низкой молекулярной массой в I группе.

Во II группе была получена сильная положительная корреляция ЦИК 2,5% с ЦИК 4,2%, $R = 0,811$ и $p < 0,0001$; сильная положительная корреляция ЦИК 2,5% с ЦИК 8%, $R = 0,71$ и $p < 0,01$; умеренная положительная корреляция ЦИК 4,2% с ЦИК 8%, $R = 0,69$ и $p < 0,01$. Как и в I группе, мы получили сильную корреляцию ЦИК с высокой и средней молекулярной массой. Была выявлена сильная корреляция ЦИК с высокой и низкой молекулярной массой, а также умеренная корреляция ЦИК со средней и низкой молекулярной массой (табл. 3).

Мы определили корреляцию между концентрациями ЦИК с разной молекулярной массой и продолжительностью клинических проявлений.

В I группе концентрация ЦИК 2,5% была в 4 раза выше, ЦИК 4,2% была в 2,5 раза выше, а ЦИК 8% была в 2 раза выше по сравнению с контрольной группой. Во II группе концентрация ЦИК 2,5% была в 6,7 раз выше, ЦИК 4,2%

была в 3 раза выше, а ЦИК 8% была в 2 раза выше по сравнению с контрольной группой. Таким образом, концентрации ЦИК с высокой, средней и низкой молекулярной массой были статистически выше во всех исследуемых группах по сравнению с контрольной группой. Уровень ЦИК с высоким молекулярным весом был статистически выше по сравнению с ЦИК с умеренным и низким молекулярным весом во всех исследуемых группах ($t = 4,63$, $p < 0,001$ по сравнению с ЦИК 4,2% и $t = 5,31$, $p < 0,001$ по сравнению с ЦИК 8,0% в I группе, $t = 3,97$, $p < 0,001$ по сравнению с ЦИК 4,2% и $t = 7,61$, $p < 0,001$ по сравнению с ЦИК 8,0% во II группе). Уровень ЦИК с умеренным молекулярным весом был выше по сравнению с концентрацией ЦИК с низким молекулярным весом во всех исследуемых группах, без достижения статистического порога (табл. 2).

Мы определили степень тяжести ЭИ согласно методу, зарегистрированному в патенте. Если в пробирке с концентрацией ПЭГ 2,5% содержание ЦИК более 10 УЕ, с концентрацией ПЭГ 4,2% содержание ЦИК более 40 УЕ и с концентрацией ПЭГ 8,0% содержание ЦИК более 240 УЕ, то диагностируют высокую степень ЭИ.

Если в пробирке с концентрацией ПЭГ 2,5% содержание ЦИК менее 10 УЕ, с концентрацией ПЭГ 4,2% содержание ЦИК менее 40 УЕ и с концентрацией ПЭГ 8,0% содержание ЦИК менее 240 УЕ, диагностируют среднюю степень ЭИ. Если в пробирке с концентрацией ПЭГ 2,5% содержание ЦИК более 10 УЕ, с концентрацией ПЭГ 4,2% содержание ЦИК менее 40 УЕ

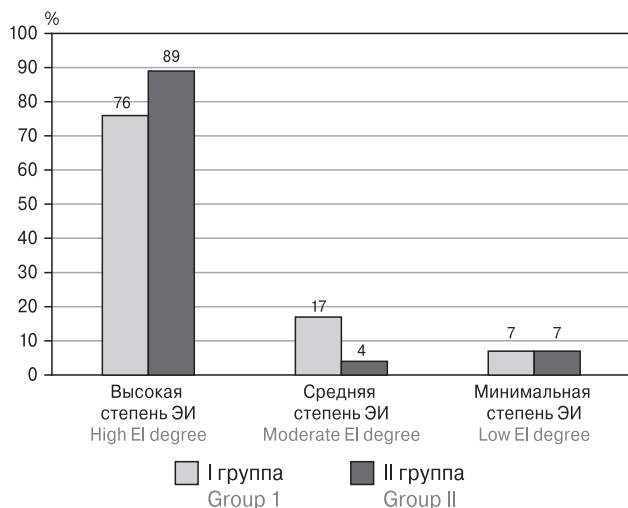


Рисунок 2. Степени оценки эндогенной интоксикации

Figure 2. Degree of assessment of endogenous intoxication

и с концентрацией ПЭГ 8,0% менее 240 УЕ, диагностируют минимальную степень ЭИ. У 22 (76%) пациентов I группы и у 24 (89%) пациентов II группы диагностировали высокую степень ЭИ. У 5 (17%) пациентов I группы и у 1 (4%) пациента II группы диагностировали среднюю степень ЭИ. У 2 (7%) пациентов I группы и у 2 (7%) пациентов II группы диагностировали минимальную степень ЭИ. Согласно результатам высокий уровень ЭИ преобладал во II группе и средний уровень ЭИ — в I группе, без достижения статистического порога ($t = 1,87$, $p > 0,05$) (рис. 2).

Обсуждение

Наше исследование — одно из немногих, посвященных количественной оценке ЭИ у пациентов с диагнозом «туберкулез легких». В его основе лежал новый метод определения тяжести интоксикационного синдрома путем измерения сывороточной концентрации ЦИК с высокой, средней и низкой молекулярной массой. Группы отобранных для исследования пациентов были сопоставимы по полу и возрасту, хотя некоторые ограничения на исследование накладывало небольшое количество обследованных пациентов.

Установлено преобладание показателей пониженной массы тела и одышки в группе пациентов с диагнозом «МЛУ-ТБ» по сравнению с больными из группы с диагнозом «лекарственно-чувствительный туберкулез». Это можно объяснить продолжительностью заболевания. Симптомы у больных туберкулезом неспецифичны (могут быть обнаружены при

любом респираторном заболевании), развиваются постепенно, длительность заболевания и ослабленный иммунитет способствуют более тяжелому течению болезни [10].

Наше исследование является первым, в котором оценивается тяжесть клинических проявлений у больных с восприимчивостью к лекарственными препаратами и лекарственно устойчивого туберкулезом легких по трем концентрациям ЦИК с разной молекулярной массой. Ghinda S., Cula E. (2014) определили содержание ЦИК с разной молекулярной массой у больных с лекарственно-устойчивым туберкулезом, получавших противотуберкулезное лечение и иммуномодулирующие препараты Меллозан и BioR [5]. Наши результаты показали, что у всех больных туберкулезом, независимо от профиля лекарственной устойчивости, концентрация ЦИК была намного выше, чем в контрольной группе. Несколько отчетов продемонстрировали высокий уровень ЦИК при легочном туберкулезе [1, 16, 17].

В нашем методе в пробирки с сывороткой крови, взятой из периферической вены, добавляли раствор ПЭГ в различных концентрациях: 2,5, 4,2 и 8,0%, что являлось новизной предлагаемого метода [13, 16, 17, 18]. Senbagavalli P. (2012) использовал PEG 5% для измерения концентрации ЦИК, которая была выше, чем в группе здоровых людей. Проведя исследование *in vitro*, авторы показали роль иммуномодулятора ЦИК в локальной генерации проинфламаторных факторов, таких как IL-4, IL-6, GM-CSF и TNF α [14].

На основании статистического анализа мы установили, что концентрация ЦИК с высокой молекулярной массой была намного выше чем ЦИК со средней и низкой молекулярной массой, так как эти молекулы имеют более низкую способность выделения и фильтрации. Также было показано, что концентрация ЦИК с низкой молекулярной массой была меньше, чем концентрация ЦИК со средней и высокой молекулярной массой, потому что первые быстро выводятся почками. Raja A. (1995) установил, что концентрация ЦИК через преципитацию ПЭГ 3,5% была выше в сыворотке пациентов с легочным туберкулезом, была значительно повышена по сравнению с контролем и снижалась во время противотуберкулезной химиотерапии [12]. Мы выяснили, что индекс лейкоцитарной интоксикации, рассчитанный по формуле Кальфа-Калифа, был ниже во всех исследуемых группах по сравнению с его контрольным значением у здоровых людей. Мордык А.В. и соавт. [1] сообщили о высоком индексе лейкоцитарной интоксикации, рассчитанном по формуле Кальфа-Калифа, до начала химиотерапии. Различия между получен-

ными результатами объяснялись критериями включения в цитируемую статью, куда вошли пациенты с обширными формами инфильтративного туберкулеза легких, такими как казеозная пневмония и лобит [1]. Мы выявили повышенное количество эозинофилов у пациентов всех исследуемых групп по сравнению с лицами контрольной группы. Этим фактом объяснялось снижение индекса лейкоцитарной интоксикации, рассчитанного по формуле Кальфа-Калифа в нашем исследовании.

Выводы

Насколько нам известно, это исследование является первым, в котором степень эндогенной интоксикации оценивается по измерению концентрации ЦИК через преципитацию с ПЭГ 2,5, 4,2 и 8,0%, что является принципиально новым для данного метода. Наши результаты показали, что концентрация ЦИК, независимо от их молекулярной массы, была выше в группах пациентов с МЛУ-ТБ, чем у больных с лекарственно-чувствительным ТБ, и выше в обеих группах пациентов по сравнению с ли-

цами контрольной группы. Наиболее высокие уровни были получены в отношении ЦИК с высокой и средней молекулярной массой. ЦИК с низкой молекулярной массой обнаруживались в меньшей концентрации. Сильная положительная корреляция ЦИК с высокой молекулярной массой и средней молекулярной массой была получена у пациентов с МЛУ-ТБ. Умеренная положительная корреляция ЦИК с высокой и низкой молекулярной массой, а также со средней и низкой молекулярной массой была получена у пациентов с МЛУ-ТБ. Высокий уровень эндогенной интоксикации преобладал в группе с МЛУ-ТБ, а средний — в группе с лекарственно-чувствительным ТБ. В связи с повышенным содержанием эозинофилов у пациентов обеих групп исследования, индекс лейкоцитарной интоксикации, рассчитанный по формуле Кальфа-Калифа, был ниже по сравнению с контрольным значением у здоровых людей. Метод измерения ЦИК с высокой, средней и низкой молекулярной массой может быть использован для оценки эндогенной интоксикации у пациентов с легочным туберкулезом.

Список литературы/References

1. Мордык А.В., Пузырева Л.В., Батищева Т.Л. Клеточные тесты реактивности и эндогенной интоксикации у впервые выявленных социально сохраненных больных с инфильтративным туберкулезом легких // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 219–224. [Mordyk A.V., Puzyreva L.V., Batishcheva T.L. Reactivity and endogenous intoxication cellular tests of the first time diagnosed socially adopted patients with infiltrative lung tuberculosis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 219–224 (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-219-224
2. Тодорико Л.Д., Еременчук И.В., Батрановская С.А., Шаповалов В.П. Динамика показателей эндогенной интоксикации при мультирезистентном туберкулезе легких с деструктивными изменениями // Актуальная инфектология. 2014. № 4. С. 55–58. [Todoriko L.D., Eremenchuk I.V., Batranovskaya S.A., Shapovalov V.P. The dynamic of the indicators of the endogenous intoxication in patients with multidrug-resistant tuberculosis with destructive changes. *Actualinaia infectologia = Actual Infectology*, 2014, no. 4, pp. 55–58. (In Russ.)]
3. Baya B., Achenbach C.J., Kone B. Clinical risk factors associated with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) in Mali. *Int. J. Infect. Dis.*, 2019, vol. 81, pp. 149–155. doi: 10.1016/j.ijid.2019.02.004
4. Eisenmann A., Murr C., Fuchs D., Ledochowski M. Gliadin IgG antibodies and circulating immune complexes. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2009, vol. 44 (2), pp. 168–171. doi: 10.1080/00365520802449328
5. Ghinda S., Cula E., Lesnic E., Chiriach T., Chiroasca V., Guila. Dynamics of circulating immune complexes in patients with tuberculosis under the influence of immunodulatory drugs. II International Conference on Microbial Biotechnology. October 9–10, 2014, Chisinau, Moldova. *Chisinau: 2014*, pp. 53–57.
6. Ghinda S., Ababii I., Danilov L., Kiroshka V., Lesnic E. Method for the assessment of the degree of the endogenous intoxication in patients with chronic tonsillitis. Short term patent, No 963 MD. 19.03.2015. BOPI s 20150071
7. Heemskerck D., Caws M., Marais B., Farrar J. Tuberculosis in adults and children. London: Springer, 2015. Chapter 3. Clinical Manifestations. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK344404>
8. Korytko Z., Kulitka E., Ghornenka G., Zachidnyy V. Use of integral hematological indices for diagnostics of athletes' adaptive processes. *J. Physical Education and Sport*, 2019, vol 19, no. 1, pp. 214–218. doi: 10.7752/jpes.2019.s1032
9. Lesnic E. Biomarkers of the oxidative stress and antioxidant system in pulmonary drug susceptible and drug resistant tuberculosis. *The Moldovan Medical Journal*, 2018, vol. 61 (1), pp. 24–28. doi: 10.5281/zenodo.1186182
10. Lesnic E., Todoriko L., Ghinda S., Caraiani O., Calenda O., Niguleanu A. General non-specific adaptive reactions and expressiveness of endogenous intoxication in pulmonary tuberculosis. *Туберкулез, легеневи хвороби, ВІЛ-інфекція*, 2015, vol. 4 (22), pp. 49–52.
11. Raja A., Narayanan P.R., Mathew R., Prabhakar R. Characterization of mycobacterial antigens and antibodies in circulating immune complexes from pulmonary tuberculosis. *J. Lab. Clin. Med.*, 1995, vol. 125, no. 5, pp. 581–587.
12. Thanadetsunton C., Ngamjanyaporn P., Setthaudom C. The model of circulating immune complexes and interleukin-6 improves the prediction of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1: 2620. doi: 10.1038/s41598-018-20947-4
13. Samuel A.M., Ashtekar M.D., Ganatra R.D. Significance of circulating immune complexes in pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 1984, vol. 58, no. 2, pp. 317–324.

14. Senbagavalli P., Hilda J.N., Ramanathan V.D., Kumaraswami V., Nutman T.B., Babu S. Immune complexes isolated from patients with pulmonary tuberculosis modulate the activation and function of normal granulocytes. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2012, vol. 19, no. 12, pp. 1965–1971. doi: 10.1128/CVI.00437-12
15. Shastri M.D., Shukla S.D., Chong W.C., Dua K., Peterson G.M., Patel R.P., Hansbro P.M., Eri R., O'Toole R.F. Role of oxidative stress in the pathology and management of human tuberculosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2018, vol. 11: 7695364. doi: 10.1155/2018/7695364
16. Simonney N., Bourrillon A., Lagrange P.H. Analysis of circulating immune complexes (CICs) in childhood tuberculosis: levels of specific antibodies to glycolipid antigens and relationship with serum antibodies. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2000, vol. 4, no. 2, pp. 152–160.
17. Wener M.H. Tests for circulating immune complexes. *Methods Mol. Biol.*, 2014, vol. 1134, pp. 47–57. doi: 10.1007/978-1-4939-0326-9_4
18. Zivot J.B., Hoffman W.D. Pathogenic effects of endotoxin. *New Horiz.*, 1995, vol. 3, no. 2, pp. 267–275.

Авторы:

Лесник Э.В., к.м.н., доцент кафедры пневмофизиологии Государственного медицинского и фармацевтического университета им. Николая Тестемицану, Кишинев, Республика Молдова;

Гинда С.С., д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунологии и аллергологии Института фтизиопульмонологии им. Кирилла Драганюка, Кишинев, Республика Молдова.

Authors:

Lesnic E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Pneumophthisiology Department, Nicolae Testemitsanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

Ghinda S.S., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Immunology and Alergology, Chiril Draganiuc Institute of Phthisiopneumology, Chisinau, Republic of Moldova.

Поступила в редакцию 25.08.2021
Отправлена на доработку 30.10.2021
Принята к печати 31.03.2022

Received 25.08.2021
Revision received 30.10.2021
Accepted 31.03.2022

СОПОСТАВЛЕНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19

А.П. Топтыгина^{1,3}, Е.Л. Семикина^{2,4}, Р.Ш. Закиров², З.Э. Афридонова¹

¹ ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГАУ НМИЦ здоровья детей Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГБОУ УВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. Вирус SARS-CoV-2, вызвавший пандемию COVID-19, является родственным коронавирусам SARS-CoV-1 и MERS, ставшим причиной эпидемий в 2003 и 2012 гг. Антитела у больных COVID-19 появляются через 7–14 дней после возникновения симптомов и постепенно нарастают. Поскольку пандемия COVID-19 продолжается, трудно сказать, как долго будет сохраняться иммунологическая память к вирусу SARS-CoV-2. Цель исследования — изучить соотношение гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 после перенесенного COVID-19. Обследованы 60 взрослых, перенесших COVID-19 легкой и средней степени тяжести за 2–12 месяцев до момента обследования. Контрольную группу составили 15 взрослых, не болевших COVID-19 и не привитых от этой инфекции. Специфические антитела к вирусу SARS-CoV-2 определяли методом ИФА с помощью набора «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ». Для определения субклассов специфических IgG и IgA анти-IgG-конъюгат из набора заменяли конъюгатом против субклассов IgG и IgA. Для определения avidности антител использовали дополнительную инкубацию с денатурирующим раствором мочевины или без нее. Мононуклеары из крови выделяли методом градиентного центрифугирования, инкубировали с S-антигеном коронавируса или без него 20 часов, окрашивали с помощью флуоресцентно меченных антител и подсчитывали на проточном цитометре BD FACSCanto II процент CD8^{high}CD107a. В контрольной группе не обнаружено ни гуморального, ни клеточного иммунитета к S-белку SARS-CoV-2. У переболевших уровень IgG-антител к S-белку SARS-CoV-2 сильно различается и жестко не связан с давностью заболевания, 57% переболевших COVID-19 имели высокий уровень гуморального ответа, а 43% — низкий. Корреляция между уровнями специфических IgG и IgA составила $r = 0,43$. Avidность антител нарастала с течением времени после заболевания, составив 49,9% на сроке 6–12 мес. Не было выявлено специфических IgG субклассов IgG2 и IgG4, а процент IgG1 нарастал со временем и составил 100% через 6–12 мес. после заболевания. 50% обследованных имели высокий клеточный иммунитет и столько же — низкий, коррелирующий с уровнем гуморального иммунитета не выявлено. Выявлены 4 варианта сочетания гуморального и клеточного иммунитета к S-белку SARS-CoV-2: высокий гуморальный и клеточный, низкий гуморальный и клеточный, высокий гуморальный и низкий клеточный и, наоборот, низкий гуморальный и высокий клеточный иммунитет.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, антитела, субклассы IgG, клеточный иммунитет, CD8⁺-лимфоциты.

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Для цитирования:

Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Закиров Р.Ш., Афридонова З.Э.
Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета
у переболевших COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3.
С. 495–504. doi: 10.15789/2220-7619-COT-1809

Citation:

Toptygina A.P., Semikina E.L., Zakirov R.Sh., Afridonova Z.E. Comparison
of the humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescents // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12,
no. 3, pp. 495–504. doi: 10.15789/2220-7619-COT-1809

COMPARISON OF THE HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY IN COVID-19 CONVALESCENTSToptygina A.P.^{a,c}, Semikina E.L.^{b,d}, Zakirov R.Sh.^b, Afridonova Z.E.^a^a G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation^b National Medical Research Center of Children's Health of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation^c Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation^d I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Abstract. The SARS-CoV-2 virus caused the COVID-19 pandemic is related to the SARS-CoV-1 and MERS coronaviruses, which were resulted in 2003 and 2012 epidemics. Antibodies in patients with COVID-19 emerge 7–14 days after the onset of symptoms and gradually increase. Because the COVID-19 pandemic is still in progress, it is hard to say how long the immunological memory to the SARS-CoV-2 virus may be retained. The aim of this study was to study a ratio between humoral and cellular immunity against the SARS-CoV-2 S protein in COVID-19 convalescents. There were enrolled 60 adults with mild to moderate COVID-19 2 to 12 months prior to the examination. The control group consisted of 15 adults without COVID-19 or unvaccinated. Specific antibodies to the SARS-CoV-2 virus were determined by ELISA with the SARS-CoV-2-IgG-ELISA-BEST kit. To determine the specific IgG and IgA subclasses, the anti-IgG conjugate from the kit was replaced with a conjugate against the IgG subclasses and IgA. Additional incubation with or without denaturing urea solution was used to determine the avidity of antibodies. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by gradient centrifugation, incubated with or without coronavirus S antigen for 20 hours, stained by fluorescently labeled antibodies, and the percentage of CD8^{high}CD107a cells was assessed on flow cytometer BD FACSCanto II. In the control group, neither humoral nor cellular immunity against the SARS-CoV-2 S protein was found. In the group of convalescents, the level of IgG antibodies against the SARS-CoV-2 S protein varies greatly not being strictly associated with the disease duration, with 57% and 43% of COVID-19 patients having high vs. low level of humoral response, respectively. A correlation between level of specific IgG and IgA was $r = 0.43$. The avidity of antibodies increased over time in convalescents comprising 49.9% at 6–12 months afterwards. No virus-specific IgG2 and IgG4 subclasses were detected, and the percentage of IgG1 increased over time comprising 100% 6–12 months after recovery. 50% of the subjects examined had high cellular immunity, no correlations with the level of humoral immunity were found. We identified 4 combinations of humoral and cellular immunity against the SARS-CoV-2 S protein: high humoral and cellular, low humoral and cellular, high humoral and low cellular, and vice versa, low humoral and high cellular immunity.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, antibodies, IgG subclasses, cellular immunity, CD8⁺ lymphocytes.

Введение

Вирус SARS-CoV-2, вызвавший пандемию COVID-19, принадлежит к β -коронавирусам, связывается на клетках с ангиотензин-превращающим ферментом 2 и является родственным SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome), теперь называемому SARS-CoV-1, и MERS (Middle Eastern Respiratory Syndrome) коронавирусам, ставшим причиной локальных зоонозных эпидемий в 2003 и 2012 гг. соответственно [12, 21, 34]. Антитела у больных COVID-19 появляются через 7–14 дней после возникновения симптомов и постепенно нарастают [26, 13, 36]. Показано, что антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2 обладают вируснейтрализующей активностью, особенно анти-RBD (Receptor Binding Domain) антитела [18]. Поскольку пандемия COVID-19 продолжается, трудно сказать, как долго будут сохраняться антитела к вирусу SARS-CoV-2. Так, антитела к HCoV-229E-коронавирусу, вызывающему респираторное заболевание, исчезали уже через год после заболевания [9, 28]. После инфекции SARS-CoV-1 и MERS антитела исчезали через 2–3 года [10, 27]. Однако есть данные, что антитела после SARS-CoV-1 определялись даже 12 лет спустя [15]. У перенесших SARS-CoV-1 через 6 лет после заболе-

вания не обнаруживали IgG⁺ В-клеток памяти, специфичных к этому вирусу, тогда как специфичные к SARS-CoV-1 Т-клетки памяти были выявлены у обследованных переболевших [31]. Специфичные к белкам вируса SARS-CoV-1 CD8⁺ Т-клетки обнаруживались даже спустя 11 лет после заболевания, что свидетельствует о длительном поддержании Т-клеточного иммунитета [24]. Однако уровни Т-клеточного и гуморального иммунитета против коронавируса слабо коррелировали между собой [20, 25].

Целью настоящего исследования было изучение соотношения гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2, сформировавшегося после перенесенного COVID-19.

Материалы и методы

В рамках простого сравнительного исследования, проходившего с января по июнь 2021 г., были обследованы 60 взрослых, перенесших COVID-19 легкой и средней степени тяжести, имевших выписку с установленным клиническим диагнозом и подтверждением диагноза методом ПЦР (основная группа). От момента заболевания до обследования прошло от 2 до 12 месяцев. В контрольную группу были включены

15 взрослых, не болевших COVID-19, не прививавшихся от этой инфекции и не имевших антител к вирусу SARS-CoV-2 при предварительном скрининге. Обследованные подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Кровь из локтевой вены брали в две вакуумные пробирки с гепарином 4 мл для исследования клеточного иммунитета и с гелем 4 мл для определения антител в сыворотке крови.

Сыворотку крови получали центрифугированием, разливали в пробирки «Эппендорф», замораживали и хранили при -70°C . Специфические антитела к вирусу SARS-CoV-2 определяли иммуноферментным анализом (ИФА) с помощью коммерческого набора «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия), позволяющего выявлять антитела полуколичественным методом в коэффициентах позитивности (КП). В сентябре 2021 г. было проведено ретестирование проб сывороток, хранившихся при -70°C на тест-системе «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия), позволяющей оценивать количество специфических антител в международных единицах Binding Antibody Units (BAU). Определение субклассов специфических IgG-антител осуществляли по ранее разработанной нами модификации ИФА-метода [6]. Мы использовали 96-луночные панели с сорбированным полноразмерным S-антигеном вируса SARS-CoV-2 из коммерческого набора для определения IgG-антител к вирусу SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия). Вместо анти-IgG-конъюгата, входящего в набор, использовали меченные пероксидазой анти-IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также анти-IgA моноклональные антитела (Полигност, Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Для определения avidности антител использовали наборы «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия) в модификации. Каждую сыворотку раскапывали в две лунки, в два соседних стрипа. После инкубации сывороток и отмывки, согласно протоколу производителя, мы проводили следующую процедуру: в лунки первого стрипа добавляли физиологический раствор 200 мкл, в лунки второго стрипа добавляли 200 мкл денатурирующего раствора мочевины и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Растворы и время инкубации были взяты из набора для определения avidности антител к кори Avidity: Anti-Measles Viruses ELISA/IgG (Euroimmun, Германия). После этого жидкость из лунок удаляли и промывали троекратно. Далее добавляли конъюгат и выполняли все процедуры по инструкции к набору «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ».

Мононуклеары периферической крови выделяли из гепаринизированной крови с по-

мощью градиентного центрифугирования на смеси фиколла-верографина, $\rho = 1,077$ (ООО «ПанЭко», Россия), отмывали от тромбоцитов и ресуспендировали в 1 мл среды RPMI-1640 с добавлением 2 mM L-глутамина, гентамицина и 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки. Суспензию мононуклеаров (3×10^5 на лунку) вносили в лунки 96-луночной стерильной панели (отрицательный контроль), добавляли раствор монензина в конечной концентрации 10 мкМ и моноклональные антитела к антигену CD107a-PE-Cy5 в конечном разведении 1:100 (контрольная проба), общий объем в лунке составил 200 мкл. Для опытной пробы использовали 96-луночные панели от набора для определения антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 методом ИФА, на дно лунок которых сорбирован полноразмерный S-белок, согласно инструкции производителя. Использован набор «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия). Поскольку лунки набора для ИФА не стерильны, перед постановкой эксперимента они были простерилизованы с помощью ультрафиолетового облучения в стерильных условиях в течение 30 мин. Опытные и контрольные пробы инкубировали при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO_2 20 часов. По окончании инкубации клетки ресуспендировали, переносили в пробирки для проточной цитометрии и отмывали центрифугированием (300g 5 мин) в растворе CellWash. Супернатант аккуратно отбирали пипеткой, а клетки окрашивали антителами к антигену CD8-FITC 20 мин в темноте при 4°C , затем повторно отмывали центрифугированием при тех же условиях и осуществляли фенотипирование на проточном цитометре BD FACS Canto II (технологии и программное обеспечение Becton Dickinson, США). Для анализа выделяли лимфоидный гейт, в нем в режиме FITC-SSS выделяли гейт лимфоцитов, высоко экспрессирующих антиген CD8 (CD8^{high}), — это субпопуляция цитотоксических Т-лимфоцитов. Далее на графике CD107a-PE-Cy5 против CD8-FITC регистрировали облако дважды положительных клеток. Полученное число отражает процент цитотоксических лимфоцитов, распознавших антигена S-белка коронавируса и ответивших цитотоксической реакцией, заключающейся в выделении содержимого цитотоксических гранул относительно общего количества CD8^+ цитотоксических Т-лимфоцитов.

Результаты исследования были подвергнуты статистической обработке. Для всех параметров было проведено исследование на нормальность распределения методом Колмогорова–Смирнова. Данные представлены в виде средней арифметической и ее ошибки ($M \pm SE$). Уровень $p < 0,05$ считали значимым. Корреляции рас-

считывали по методу Пирсона. Для расчета уровня антител использовали коэффициент позитивности (КП) как отношение оптической плотности в пробе к оптической плотности в отрицательном контроле, к которой прибавляли 0,2 согласно инструкции производителя. При этом cut-off составляет 1,1. Для вычисления avidности антител значение в первой лунке (инкубация с физиологическим раствором) принимали за 100% и вычисляли процент для значения во второй лунке (инкубация с денатурирующим раствором).

Результаты

У здоровых, не болевших и не привитых против вируса SARS-CoV-2 людей (контрольная группа) не было выявлено антител к этому вирусу ни IgG, ни IgA. В группе переболевших такие антитела были обнаружены (рис. 1А). Оценку уровней антител проводили полуколичественным методом в КП, поскольку на момент проведения исследований количественных тест-систем не было. Средняя арифметическая по группе для IgG-антител составила $17,08 \pm 1,94$, а для IgA — $11,43 \pm 1,32$. Следует отметить, что в использованной тест-системе при расчете КП cut-off составляет 1,1. Максимальное значение для IgG составило 56,08, а для IgA — 48,78. При этом у 6 человек не было выявлено IgG-антител, а у 7 отсутствовали IgA-антитела к вирусу SARS-CoV-2. Важно, что из этих 6 человек без специфических IgG у двоих были выявлены высокие уровни IgA, а у четверых не было ни IgG, ни IgA. В то же время у троих с высокими IgG не было IgA. По уровню специфических IgG-антител обследованные лица были разделены на две подгруппы: с высоким и низким уровнем

гуморального ответа на инфекцию. Пороговый критерий составил 10 единиц. В группу с высоким ответом были отнесены 34 человека, а с низким — 26 человек (рис. 1Б). Различия между этими группами и для IgG, и для IgA оказались значимыми ($p < 0,05$), см. рис. 1А. Корреляция между уровнями специфических IgG и IgA была средняя положительная ($r = 0,43$), так как есть люди с высокими IgG и низкими IgA и наоборот. Не выявлено корреляции между сроком, прошедшим после заболевания, и высотой гуморального ответа. Для сопоставления уровней IgG-антител, выраженных в КП, с количеством IgG-антител, выраженном в BAU, было проведено ретестирование проб сывороток обследованных лиц. На рис. 1А правая вертикальная ось представляет калибровку в BAU. Важно, что 6 человек, не имевших специфических IgG-антител к вирусу SARS-CoV-2 при измерении в КП, также не имели их при измерении в BAU. Выявлена очень сильная положительная корреляция между уровнями специфических IgG, выраженными в КП и в BAU ($r = 0,98$).

В процессе созревания гуморального иммунного ответа происходит повышение avidности антител и переключение субклассов IgG-антител преимущественно на IgG1. В группе переболевших COVID-19 была исследована avidность специфических антител. Выявлена положительная корреляция средней силы ($r = 0,53$) между сроком, прошедшим после заболевания, и avidностью антител. Основная группа была разбита на 3 подгруппы в зависимости от срока после заболевания. В подгруппу до 3 мес. вошел 21 человек, 3–6 мес. — 20 человек, более 6 мес. — 19 человек. Была рассчитана средняя avidность для этих подгрупп. Результаты представлены на рис. 2А. Из рисунка видно, что avidность ан-

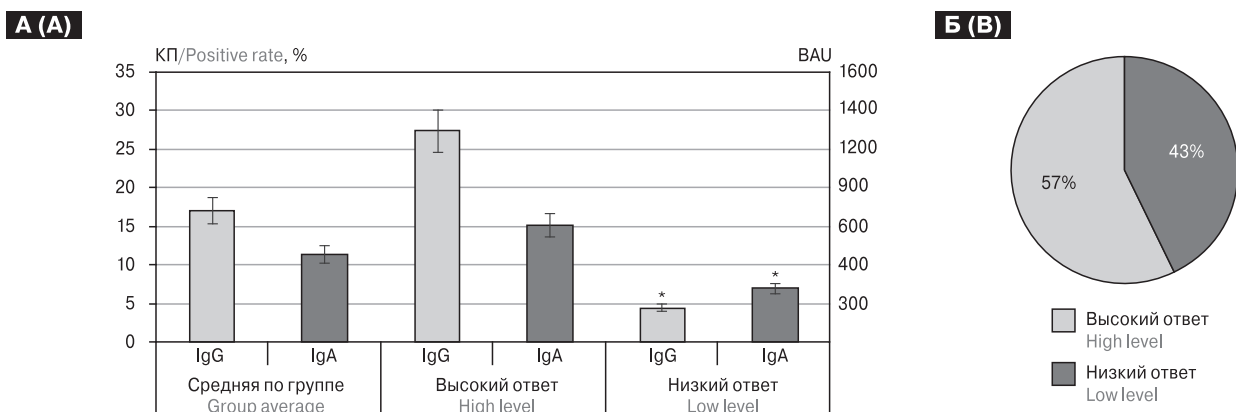


Рисунок 1. Гуморальный иммунный ответ на S-белок вируса SARS-CoV-2

Figure 1. Humoral immune response against the SARS-CoV-2 S protein

Примечание. А — уровень IgG- и IgA-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших COVID-19, Б — распределение переболевших COVID-19 по уровню гуморального ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2.

Note. A — the level of serum SARS-CoV-2 S protein-specific IgG and IgA antibodies in COVID-19 patients, B — distribution of COVID-19 patients based on the level of humoral response against the SARS-CoV-2 S protein.

тител к S-белку вируса SARS-CoV-2 значимо растет с увеличением срока после заболевания ($p < 0,05$). Коэффициент корреляции между уровнем специфических IgG-антител и их авидностью слабо положительный ($r = 0,32$). Также в основной группе был исследован спектр субклассов анти-S IgG-антител. Важно, что ни у одного из переболевших COVID-19 не было выявлено специфичных к S-белку коронавируса антител субклассов IgG2 и IgG4. Зрелость гуморального иммунитета к S-белку коронавируса оценивали по проценту антител субкласса IgG1 в общем IgG-ответе на S-белок. Корреляция между сроком после заболевания и процентом IgG1-антител в общем специфическом IgG-ответе была положительная, но очень слабая ($r = 0,28$). Однако при расчете этого показателя по подгруппам в зависимости от срока после заболевания выявлено значимое возрастание процента IgG1 ($p < 0,05$), а в подгруппе более 6 мес. у всех обследованных субкласс IgG1 составлял 100% от IgG-антител против S-белка вируса SARS-CoV-2.

При исследовании клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 было показано, что спонтанный уровень экспрессии молекулы CD107a на CD8^{high}-лимфоцитах не превышал уровень cut-off, равный 1%. В контрольной группе уровень индуцированной S-белком экспрессии CD107a также не превышал 1% и не отличался от спонтанного уровня. В основной группе было выявлено значимое ($p < 0,05$) превышение над спонтанным уровнем CD8^{high}CD107a⁺ в ответ на индукцию S-белком коронавируса, средняя арифметическая по группе составила $6,48 \pm 0,61\%$ (рис. 3А). Так же, как и при анализе гуморального иммунитета, обследованные лица были разделены на две подгруппы — с высоким и низким уровнем клеточного ответа на ин-

фекцию. Пороговый критерий составил 6%. Обследованные переболевшие разделились на 2 группы по этому критерию строго пополам — 30 и 30 человек (см. рис. 3Б). Различия в уровне индуцированной S-белком экспрессии CD107a на CD8^{high}-лимфоцитах для этих групп оказались значимыми ($p < 0,05$), см. рис. 3А. Корреляции между уровнем клеточного иммунитета и сроком после заболевания обнаружено не было.

При сопоставлении специфического гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19 было выделено 4 варианта соотношения этих параметров (рис. 4). В группу А вошли 19 человек, имевших высокий гуморальный (средняя для IgG — $26,84 \pm 3,08$; для IgA — $16,65 \pm 2,02$) и клеточный (средняя для CD8^{high}CD107a⁺ — $10,39 \pm 0,87\%$) иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2. В группу Б вошли 15 человек, имевших низкий гуморальный (средняя для IgG — $6,22 \pm 0,65$; для IgA — $6,88 \pm 1,17$) и клеточный (средняя для CD8^{high}CD107a⁺ — $3,8 \pm 0,44\%$) иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2. В группу В вошли 15 переболевших, имевших высокий гуморальный (средняя для IgG — $29,3 \pm 3,71$; для IgA — $16,37 \pm 2,05$) и низкий клеточный (средняя для CD8^{high}CD107a⁺ — $1,64 \pm 0,31\%$) иммунитет к S-белку коронавируса. А в группу Г вошли 11 человек с низким гуморальным (средняя для IgG — $1,06 \pm 0,18$; для IgA — $6,09 \pm 2,34$) и высоким клеточным (средняя для CD8^{high}CD107a⁺ — $8,3 \pm 0,92\%$) иммунитетом к S-белку. Корреляции между уровнем гуморального и клеточного иммунитета к S-белку выявлено не было. Важно, что у тех 6 человек, у которых после перенесенного COVID-19 не было выявлено анти-S-IgG-антител, был обнаружен клеточный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2.

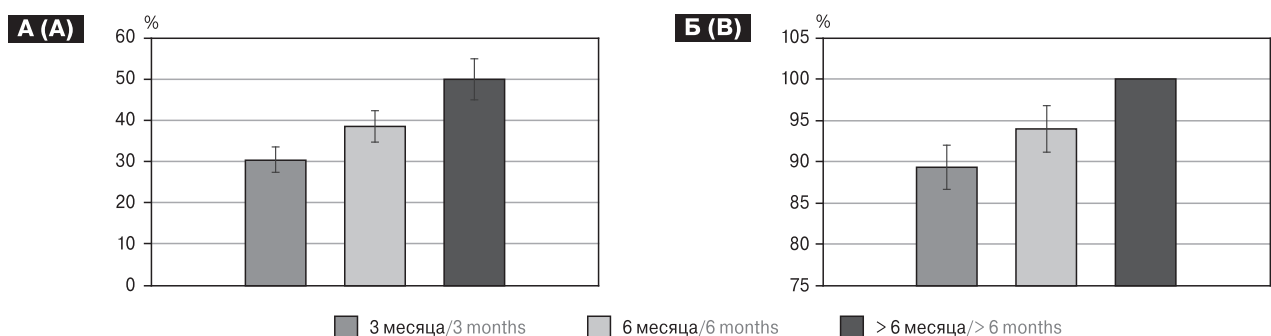


Рисунок 2. Созревание гуморального иммунного ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2

Figure 2. Maturation of the humoral immune response to the S-protein of the SARS-CoV-2 virus

Примечание. А — авидность антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших COVID-19 в зависимости от срока после заболевания, Б — процент антител субкласса IgG1 к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших COVID-19 в зависимости от срока после заболевания.

Note. A — avidity of antibodies to the S-protein of the SARS-CoV-2 virus in the serum of COVID-19 patients, depending on the period after disease, B — percentage of IgG1 subclass antibodies to the S protein of the SARS-CoV-2 virus in the serum of COVID-19 patients, depending on the period after disease.

Обсуждение

В результате проведенного исследования удалось показать, что уровень антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 сильно различается от полного отсутствия до очень высокого уровня и жестко не связан с давностью заболевания. По-видимому, есть люди, синтезирующие высокий уровень антител, а есть индивидуумы с низким

антительным ответом. Это особенность их организма. Возможно, это связано с гетерогенностью HLA, а может быть, и с какими-то иными индивидуальными особенностями иммунной системы. По нашим данным, 57% переболевших COVID-19 имели высокий уровень гуморального ответа, а 43% — низкий. Эти данные хорошо соотносятся с данными Robbiani D.F. и соавт., которые показали, что среди реконва-

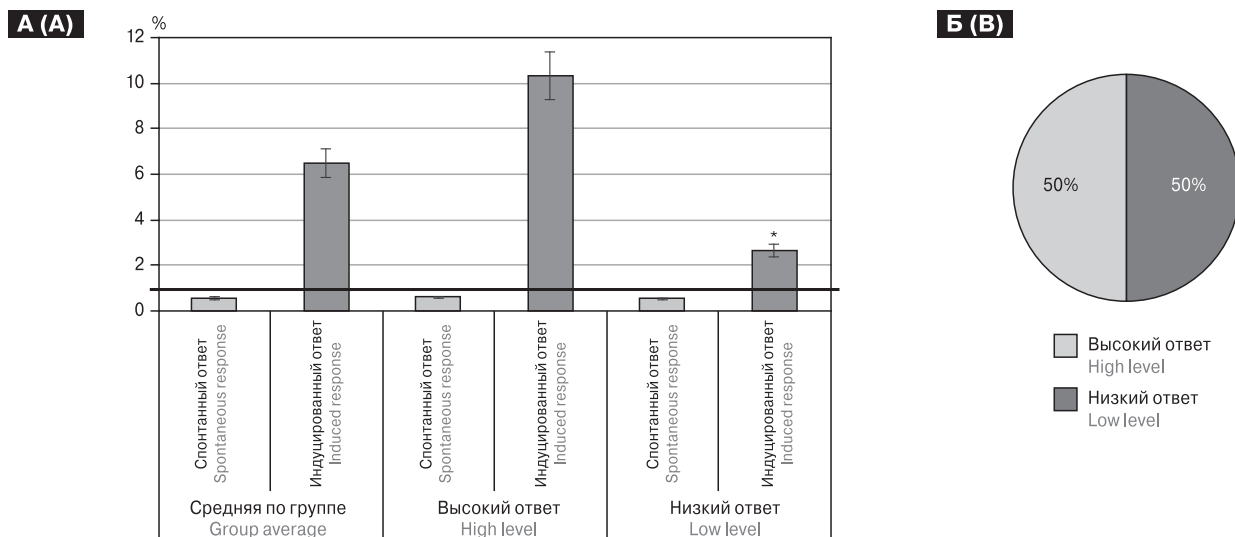


Рисунок 3. Клеточный иммунный ответ на S-белок вируса SARS-CoV-2

Figure 3. Cellular immune response to the S protein of the SARS-CoV-2 virus

Примечание. А — процент CD8^{high}CD107a⁺ лимфоцитов от общего уровня цитотоксических Т-клеток после экспозиции S-белка вируса SARS-CoV-2, Б — распределение переболевших COVID-19 по уровню специфического клеточного ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2.

Note. А — percentage of CD8^{high}CD107a⁺ lymphocytes from the total level of cytotoxic T cells after exposure to the S protein of the SARS-CoV-2 virus, В — distribution of COVID-19 patients by the level of specific cellular response to the S protein of the SARS-CoV-2 virus.

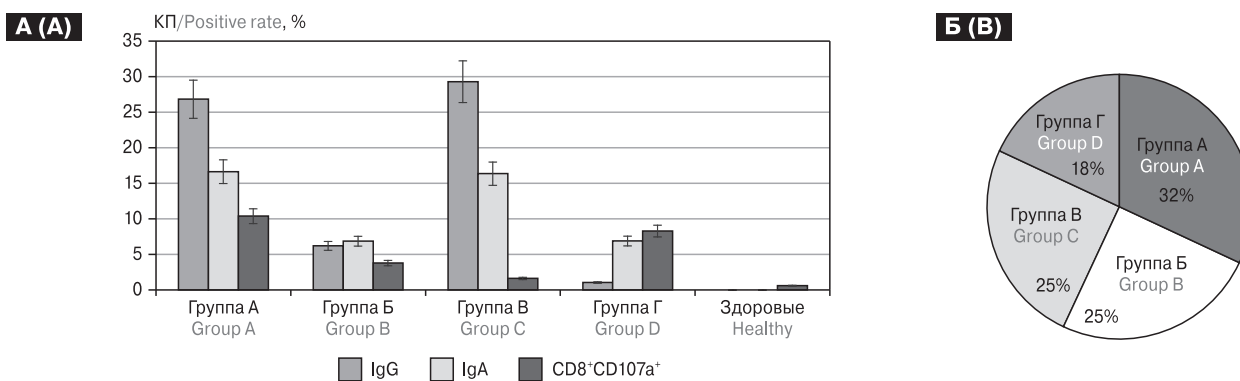


Рисунок 4. Сопоставление специфического гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19

Figure 4. Comparison of specific humoral and cellular immunity to the S protein of the SARS-CoV-2 virus in COVID-19 reconvalescents

Примечание. А — уровень гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 в 4 группах переболевших COVID-19 в зависимости от соотношения этих параметров, Б — распределение переболевших COVID-19 на 4 группы по соотношению уровней специфического гуморального и клеточного иммунитета.

Note. А — the level of humoral and cellular immunity to the S protein of the SARS-CoV-2 virus in 4 groups of COVID-19 reconvalescents, depending on the ratio of these parameters, В — distribution of COVID-19 reconvalescents into 4 groups according to the ratio of the levels of specific humoral and cellular immunity.

лесцентом через 49 дней после COVID-19 у 33% обнаруживались низкие вируснейтрализующие антитела, а у 67% — высокие [29]. Аналогичные результаты были получены и другими исследователями. Было оказано, что уровень специфического гуморального ответа на антигены вируса SARS-CoV-2 не одинаков у разных пациентов и на него влияет степень тяжести заболевания. После выздоровления уровень специфического иммунитета постепенно снижается [23, 30]. Относительно скорости снижения уровня антител после перенесенного COVID-19 существует много исследований, но, поскольку пандемия продолжается, трудно сказать, как реально долго будут держаться антитела. Так, есть работы, в которых показано, что специфические IgG-антитела сохраняются на прежнем уровне через 3 месяца [16, 17], через 5–6 месяцев [33]. Наши данные показывают, что и через 9–12 месяцев у определенной группы переболевших сохраняются достаточно высокие уровни антител. Специфические IgA-антитела появляются на 5–7 день от начала заболевания [23, 30], интенсивность их снижения сильно различается у разных пациентов, что вполне согласуется с нашими данными. Аналогичная динамика специфических IgA-антител показана и при других вирусных заболеваниях, например кори и краснухе. Также выявленные нами редкие случаи, когда при отсутствии у переболевших специфических IgG имелись высокие уровни специфических IgA, наблюдались у пациентов после кори и краснухи [2]. Известно, что после перенесенной кори формируется пожизненный иммунитет, как гуморальный, так и клеточный, тогда как про иммунитет после COVID-19 все еще многое непонятно. Считаем, что сопоставление мало изученного постковидного иммунитета с хорошо изученным иммунитетом после перенесенной кори дает основание для анализа и, возможно, понимания особенностей поддержания иммунологической памяти после COVID-19.

Известно, что со временем происходит созревание антител: как их Fab-фрагментов, так как авидность антител возрастает, так и константной части, поскольку нарастает процент антител, относящихся к IgG1-субклассу. Интересно, что после таких вирусных инфекций, как корь или краснуха, авидность антител через 6–12 месяцев после заболевания достигает 90% и даже выше, а после COVID-19 на тех же сроках — всего 49,9% с максимальным значением 68,1% [5]. В нашей работе было показано, что после перенесенного COVID-19 специфические IgG представлены IgG1- и IgG3-субклассами, тогда как антител субклассов IgG2 и IgG4, специфичных к S-белку коронавируса, обнаружено не было. Аналогичные данные были

представлены и другими авторами [8, 22]. Ранее нами было показано, что у ранних реконвалесцентом после кори формируются специфические IgG-антитела всех четырех субклассов, при этом преобладают IgG3 и IgG2, постепенно на первое место выдвигаются IgG1-антитела, и через год и более этот субкласс преобладает среди специфических противокоревых антител, составляя около 70% IgG-антител, но антитела остальных субклассов также присутствуют, сохраняясь много лет в виде минорных субклассов [4, 5]. В случае пациентов, перенесших COVID-19, уже через 6–12 месяцев после заболевания специфические антитела представлены только IgG1-субклассом. Известно, что IgG1- и IgG3-антитела активно вовлечены в такие эффекторные механизмы иммунной системы, как антителозависимая активация комплемента, антителозависимая клеточная цитотоксичность NK-клеток и антителозависимый фагоцитоз [32]. Показано, что эти механизмы участвуют в патогенезе COVID-19 и весьма важны для выживания пациентов [7]. Показано, что уровень специфических IgG3 положительно коррелирует с тяжестью течения заболевания [35].

Клеточный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2 также сильно различался по уровню. Так, 50% обследованных имели высокий клеточный иммунитет и столько же — низкий, корреляций с уровнем гуморального иммунитета выявлено не было. Похожие данные были представлены Stephens D.S. и соавт. Показано, что уровень специфического клеточного ответа у переболевших COVID-19 не одинаков у разных пациентов, и на него влияет степень тяжести заболевания [29]. Также было показано, что клеточный ответ у реконвалесцентом после COVID-19 обнаруживается для CD4⁺ в 100% случаев, а для CD8⁺ — в 70%. При этом ответ CD4⁺-лимфоцитов коррелировал с уровнем специфических IgG и IgA, а ответ CD8⁺ — нет [14]. Однако именно CD8⁺-лимфоциты, являясь цитотоксическими клетками, вовлечены в непосредственное уничтожение инфицированных вирусом клеток. Интересно, что уровень специфического клеточного иммунитета к антигенам вируса кори, определенный тем же методом, что и в настоящей работе, был существенно ниже, едва достигая 6% [3], тогда как на S-белок коронавируса ответ достигал 16%, а уровень 6% стал cut-off для разделения высокого и низкого ответа. Возможно, такой высокий уровень ответа связан с вовлечением гетерологичных иммунных ответов CD8⁺-клеток [1]. Так, была показана перекрестная реактивность Т-лимфоцитов переболевших SARS в 2003 г. с антигенами N-белка SARS-CoV-2 [19], но, по мнению авторов, это не за-

щищает от заболевания COVID-19. При сопоставлении гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 нами выявлены 4 варианта сочетания: высокий гуморальный и клеточный, низкий гуморальный и клеточный, высокий гуморальный и низкий клеточный и, наоборот, низкий гуморальный и высокий клеточный иммунитет. Это объясняет отсутствие корреляции между клеточным и гуморальным ответом. Действительно, ответ антител и ответ специфических CD8⁺-лимфоцитов развивается независимо и определяется разными генетически обусловленными факторами. Похожие результаты были получены группой авторов Dan J.M. и соавт. Они исследовали 5 параметров специфического иммунитета у 185 реконвалесцентов: антитела IgG и IgA, В-клетки памяти, CD4⁺- и CD8⁺-клеточный иммунитет к вирусу SARS-CoV-2. Показано, что все параметры сохраняются более 6 месяцев. Через 2 месяца после заболевания 49% имели 5 из 5 параметров; через 6 и бо-

лее месяцев 40% имели 5 из 5 параметров, а 96% имели 3 из 5 параметров защиты в разных сочетаниях [11].

Заключение

Таким образом, нам удалось показать, что специфический иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2, как гуморальный, так и клеточный, формируется у переболевших COVID-19 и сохраняется многие месяцы. Среди обследованных переболевших были такие, у кого не было антител, но был высокий клеточный иммунитет, и наоборот, были высокие антитела и отсутствовал клеточный, но не было среди переболевших тех, у кого вообще не отмечалось никакого специфического ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2. Выявленные 4 варианта сочетания уровней специфического гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 свидетельствуют о независимом формировании и поддержании этих звеньев иммунитета.

Список литературы/References

1. Топтыгина А.П. Гетерологичные иммунные ответы в норме и при патологии // *Инфекция и иммунитет*. 2020. Т. 10, № 2. С. 269–276. [Toptygina A.P. Heterologous immune responses in health and disease. *Infektsiya i иммунитет = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 269–276. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-HIR-1292]
2. Топтыгина А.П. Общие закономерности формирования и поддержания специфического гуморального иммунного ответа на примере ответа на вирусы кори и краснухи // *Инфекция и иммунитет*. 2014. Т. 4, № 1. С. 7–14. [Toptygina A.P. Common mechanisms of specific humoral immune response' shaping and sustaining by the example of immune response to measles and rubella viruses. *Infektsiya i иммунитет = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, vol. 4, no. 1, pp. 7–14. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-2014-1-7-14]
3. Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Смердова М.А., Зеткин А.Ю., Клыкова Т.Г. Формирование гуморального и клеточного иммунитета на коревую вакцину у взрослых // *Инфекция и иммунитет*. 2020. Т. 10, № 1. С. 137–144. [Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu., Smerdova M.A., Zetkin A.Yu., Klykova T.G. Formation of humoral and cellular immunity to measles vaccine in adults. *Infektsiya i иммунитет = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 137–144. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-FOH-1334]
4. Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Смердова М.А., Наврузова Л.Н., Малеев В.В. Сопоставление гуморального иммунного ответа у взрослых больных корью и привитых от этой инфекции // *Инфекция и иммунитет*. 2021. Т. 11, № 3. С. 517–522. [Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu., Smerdova M.A., Navruzova L.N., Maleev V.V. Comparing humoral immune response in adult measles patients and measles vaccinated subjects. *Infektsiya i иммунитет = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 517–522. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-CHI-1396]
5. Топтыгина А.П., Мамаева Т.А., Алешкин В.А. Особенности специфического гуморального иммунного ответа против вируса кори // *Инфекция и иммунитет*. 2013. Т. 3, № 3. С. 243–250. [Toptygina A.P., Mamaeva T.A., Alioshkin V.A. Peculiarities of specific humoral measles immune response. *Infektsiya i иммунитет = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 3, pp. 243–250. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-2013-3-243-250]
6. Топтыгина А.П., Пухальский А.Л., Мамаева Т.А., Алешкин В.А. Спектр субклассов противокоревых иммуноглобулинов G у лиц, перенесших корь // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2004. Т. 137, № 3. С. 293–295. [Toptygina A.P., Pukhalskii A.L., Mamaeva T.A., Alioshkin V.A. Spectrum of anti-measles immunoglobulin G subclasses in convalescents after measles. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2004, vol. 137, no. 3, pp. 293–295. (In Russ.) doi: 10.1023/B:BEBM.0000031564.27747.b4]
7. Atyeo C., Fischinger S., Zohar T., Stein M.D., Burke J., Loos C., McCulloch D.J., Newman K.L., Wolf C., Yu J., Shuey K., Feldman J., Hauser B.M., Caradonna T., Schmidt A.G., Suscovich T.J., Linde C., Cai Y., Barouch D., Ryan E.T., Charles R.C., Lauffenburger D., Chu H., Alter G. Distinct early serological signatures track with SARS-CoV-2 survival. *Immunity*, 2020, vol. 53, no. 3, pp. 524–532.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2020.07.020
8. Bobik T.V., Kostin N.N., Skryabin G.A., Tsbai P.N., Simonova M.A., Knorre V.D., Stratienko O.N., Aleshchenko N.L., Vorobiev I.I., Khurs E.N., Mokrushina Yu.A., Smirnov I.V., Alekhin A.I., Nikitin A.E., Gabibov A.G. COVID-19 in Russia: clinical and immunological features of the first-wave patients. *Acta Naturae*, 2021, vol. 13, no. 1 (48), pp. 102–115. doi: 10.32607/actanaturae.11374
9. Callow K.A., Parry H.F., Sergeant M., Tyrrell D.A. The time course of the immune response to experimental coronavirus infection of man. *Epidemiol. Infect.*, 1990, vol. 105, pp. 435–446.

10. Cao W.C., Liu W., Zhang P.H., Zhang F., Richardus J.H. Disappearance of antibodies to SARS-associated coronavirus after recovery. *N. Engl. J. Med.*, 2007, vol. 357, no. 11, pp. 1162–1163. doi: 10.1056/NEJMc070348
11. Dan J.M., Mateus J., Kato Y., Hastie K.M., Yu E.D., Faliti C.E., Grifoni A., Ramirez S.I., Haupt S., Frazier A., Nakao C., Rayaprou V., Rawlings S.A., Peters B., Krammer F., Simon V., Saphire E.O., Smith D.M., Weiskopf D., Sette A., Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, 2021, vol. 371, no. 6529: eabf4063. doi: 10.1126/science.abf4063
12. De Wit E., van Doremalen N., Falzarano D., Munster V.J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2016, vol. 14, pp. 523–534. doi: 10.1038/nrmicro.2016.81
13. Graham N.R., Whitaker A.N., Strother C.A., Miles A.K., Grier D., McElvany B.D., Bruce E.A., Poynter M.E., Pierce K.K., Kirkpatrick B.D., Stapleton R.D., An G., van den Broek-Altenburg E., Botten J.W., Crothers J.W., Diehl S.A. Kinetics and isotype assessment of antibodies targeting the spike protein receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 in COVID-19 patients as a function of age, biological sex and disease severity. *Clin. Transl. Immunol.*, 2020, vol. 9, no. 10: e1189. doi: 10.1002/cti2.1189
14. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jardi R.S., Marrama D., de Silva A.M., Frazier A., Carlin A.F., Greenbaum J.A., Peters B., Krammer F., Smith D.M., Crotty S., Sette A. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*, 2020, vol. 181, no. 7, pp. 1489–1501. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015
15. Guo C., Li B., Ma H., Wang X., Cai P., Yu Q., Zhu L., Jin L., Jiang C., Fang J., Liu Q., Zong D., Zhang W., Lu Y., Li K., Gao X., Fu B., Liu L., Ma X., Weng J., Wei H., Jin T., Lin J., Qu K. Single-cell analysis of two severe COVID-19 patients reveals a monocyte-associated and tocilizumab-responding cytokine storm. *Nat. Commun.*, 2020, vol. 11, no. 1: 3924. doi: 10.1038/s41467-020-17834-w
16. Isho B., Abe K.T., Zuo M., Jamal A.J., Rathod B., Wang J.H., Li Z., Chao G., Rojas O.L., Bang Y.M., Pu A., Christie-Holmes N., Gervais C., Ceccarelli D., Samavarchi-Tehrani P., Guvenc F., Budyowski P., Li A., Paterson A., Yue F.Y., Marin L.M., Caldwell L., Wrana J.L., Colwill K., Sicheri F., Mubareka S., Gray-Owen S.D., Drews S.J., Siqueira W.L., Barrios-Rodiles M., Ostrowski M., Rini J.M., Durocher Y., McGeer A.J., Gomerman J.L., Gingras A.-C. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Sci. Immunol.*, 2020, vol. 5: eabe5511. doi: 10.1126/sciimmunol.abe5511
17. Iyer A.S., Jones F.K., Nodoushani A., Kelly M., Becker M., Slater D., Mills R., Teng E., Kamruzzaman M., Garcia-Beltran W.F., Astudillo M., Yang D., Miller T.E., Oliver E., Fischinger S., Atyeo C., Iafraite A.J., Calderwood S.B., Lauer S.A., Yu J., Li Z., Feldman J., Hauser B.M., Caradonna T.M., Branda J.A., Turbett S.E., LaRocque R.C., Mellon G., Barouch D.H., Schmidt A.G., Azman A.S., Alter G., Ryan E.T., Harris J.B., Charles R.C. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. *Sci. Immunol.*, 2020, vol. 5, no. 52: eabe0367. doi: 10.1126/sciimmunol.abe0367
18. Ju B., Zhang Q., Ge J., Wang R., Sun J., Ge X., Yu J., Shan S., Zhou B., Song S., Tang X., Yu J., Lan J., Yuan J., Wang H., Zhao J., Zhang S., Wang Y., Shi X., Liu L., Zhao J., Wang X., Zhang Z., Zhang L. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature*, 2020, vol. 584, no. 7819, pp. 115–119. doi: 10.1038/s41586-020-2380-z
19. Le Bert N., Tan A.T., Kunasegaran K., Tham C.Y.L., Hafezi M., Chia A., Chng M.H.Y., Lin M., Tan N., Linster M., Chia W.N., Chen M.I.-C., Wang L.-F., Ooi E.E., Kalimuddin S., Tambyah P.A., Low J.G.-H., Tan Y.-J., Bertoletti A. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*, 2020, vol. 584, pp. 457–462. doi: 10.1038/s41586-020-2550-z
20. Li C.K.-F., Wu H., Yan H., Ma S., Wang L., Zhang M., Tang X., Temperton N.J., Weiss R.A., Brenchley J.M., Douek D.C., Mongkolsapaya J., Tran B.-H., Lin C.-L.S., Srean G.R., Hou J.-L., McMichael A.J., Xu X.-N. T cell responses to whole SARS coronavirus in humans. *J. Immunol.*, 2008, vol. 181, no. 8, pp. 5490–5500. doi: 10.4049/jimmunol.181.8.5490
21. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D., Xu W., Holmes E.C., Gao G.F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10224, pp. 565–574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8
22. Luo H., Jia T., Chen J., Zeng S., Qiu Z., Wu S., Li X., Lei Y., Wang X., Wu W., Zhang R., Zou X., Feng T., Ding R., Zhang Y., Chen Y.-Q., Sun C., Wang T., Fang S., Shu Y. The characterization of disease severity associated IgG subclasses response in COVID-19 patients. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 632814. doi: 10.3389/fimmu.2021.632814
23. Lynch K.L., Whitman J.D., Lacanienta N.P., Beckerdite E.W., Kastner S.A., Shy B.R., Goldgof G.M., Levine A.G., Bapat S.P., Stramer S.L., Esensten J.H., Hightower A.W., Bern C., Wu A.H.B. Magnitude and kinetics of anti-SARS-CoV-2 antibody responses and their relationship to disease severity. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 72, no. 2, pp. 301–308. doi: 10.1093/cid/ciaa979
24. Ng O.-W., Chia A., Tan A.T., Jardi R.S., Leong H.N., Bertoletti A., Tan Y.-J. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine*, 2016, vol. 34, no. 17, pp. 2008–2014. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.02.063
25. Ni L., Ye F., Chen M.-L., Feng Y., Deng Y.-Q., Zhao H., Wei P., Ge J., Gou M., Li X., Sun L., Cao T., Wang P., Zhou C., Zhang R., Liang P., Guo H., Wang X., Qin C.F., Chen F., Dong C. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunology*, 2020, vol. 52, no. 6, pp. 971–977.e3. doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.023
26. Okba N.M.A., Muller M.A., Li W., Wang C., GeurtsvanKessel C.H., Corman V.M., Lamers M.M., Sikkema R.S., de Bruin E., Chandler F.D., Yazdanpanah Y., Le Hingrat Q., Descamps D., Houhou-Fidouh N., Reusken C.B.E.M., Bosch B.J., Drosten C., Koopmans M.P.G., Haagmans B.L. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease 2019 patients. *Emerg. Infect. Dis.*, 2020, vol. 26, no. 7, pp. 1478–1488. doi: 10.3201/eid2607.200841
27. Payne D.C., Iblan I., Rha B., Alqasrawi S., Haddadin A., Al Nsour M., Alsanouri T., Ali S.S., Harcourt J., Miao C., Tamin A., Gerber S.I., Haynes L.M., Al Abdallat M.M. Persistence of antibodies against middle east respiratory syndrome coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.*, 2016, vol. 22, no. 10, pp. 1824–1826. doi: 10.3201/eid2210.160706

28. Reed S.E. The behaviour of recent isolates of human respiratory coronavirus in vitro and in volunteers: evidence of heterogeneity among 229E related strains. *J. Med. Virol.*, 1984, vol. 13, no. 2, pp. 179–192. doi: 10.1002/jmv.1890130208
29. Robbiani D.F., Gaebler C., Muecksch F., Lorenzi J.C.C., Wang Z., Cho A., Agudelo M., Barnes C.O., Gazumyan A., Finkin S., Hägglöf T., Oliveira T.Y., Viant C., Hurley A., Hoffmann H.H., Millard K.G., Kost R.G., Cipolla M., Gordon K., Bianchini F., Chen S.T., Ramos V., Patel R., Dizon J., Shimeliovich I., Mendoza P., Hartweg H., Nogueira L., Pack M., Horowitz J., Schmidt F., Weisblum Y., Michailidis E., Ashbrook A.W., Waltari E., Pak J.E., Huey-Tubman K.E., Koranda N., Hoffman P.R., West A.P. Jr., Rice C.M., Hatzioannou T., Bjorkman P.J., Bieniasz P.D., Caskey M., Nussenzweig M.C. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature*, 2020, vol. 584, no. 7821, pp. 437–442. doi: 10.1038/s41586-020-2456-9
30. Stephens D.S., McElrath M.J. COVID-19 and the path to immunity. *JAMA*, 2020, vol. 324, no. 13, pp. 1279–1281. doi: 10.1001/jama.2020.16656
31. Tang F., Quan Y., Xin Z.T., Wrarmert J., Ma M.J., Lv H., Wang T.B., Yang H., Richardus J.H., Liu W., Cao W.C. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study. *J. Immunol.*, 2011, vol. 186, no. 12, pp. 7264–7268. doi: 10.4049/jimmunol.0903490
32. Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.*, 2014, vol. 5: 520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520
33. Wajnberg A., Amanat F., Firpo A., Altman D.R., Bailey M.J., Mansour M., McMahon M., Meade P., Mendu D.R., Muellers K., Stadlbauer D., Stone K., Strohmeier S., Simon V., Aberg J., Reich D.L., Krammer F., Cordon-Cardo C. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*, 2020, vol. 370, pp. 1227–1230. doi: 10.1126/science.abd7728
34. Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.*, 2020, vol. 94, no. 7: e00127–20. doi: 10.1128/JVI.00127-20
35. Yates J.L., Ehrbar D.J., Hunt D.T., Girardin R.C., Dupuis A.P. 2nd, Payne A.F., Sowizral M., Varney S., Kulas K.E., Demarest V.L., Howard K.M., Carson K., Hales M., Ejemel M., Li Q., Wang Y., Peredo-Wende R., Ramani A., Singh G., Strle K., Mantis N.J., McDonough K.A., Lee W.T. Serological analysis reveals an imbalanced IgG subclass composition associated with COVID-19 disease severity. *Cell Rep. Med.*, 2021, vol. 2, no. 7: 100329. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100329
36. Zhao J., Yuan Q., Wang H., Liu W., Liao X., Su Y., Wang X., Yuan J., Li T., Li J., Qian S., Hong C., Wang F., Liu Y., Wang Z., He Q., Li Z., He B., Zhang T., Fu Y., Ge S., Liu L., Zhang J., Xia N., Zhang Z. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 71, no. 16, pp. 2027–2034. doi: 10.1093/cid/ciaa344

Авторы:

Топтыгина А.П., д.м.н., ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории цитокинов ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор кафедры иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

Семикина Е.Л., д.м.н., главный научный сотрудник, зав. централизованной клинко-диагностической лабораторией ФГАУ НМИЦ здоровья детей Минздрава РФ, Москва, Россия; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

Закиров Р.Ш., врач клинической лабораторной диагностики централизованной клинко-диагностической лаборатории ФГАУ НМИЦ здоровья детей Минздрава РФ, Москва, Россия;

Афридонова З.Э., аспирант лаборатории цитокинов ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

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

Semikina E.L., PhD, MD (Medicine), Head Researcher, Head of the Centralized Diagnostics Laboratory, National Medical Research Center of Children's Health of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Zakirov R.Sh., Clinical Laboratory Specialist, Centralized Diagnostics Laboratory, National Medical Research Center of Children's Health of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Afridonova Z.E., PhD Student, Laboratory of Cytokines, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.10.2021
Отправлена на доработку 15.01.2022
Принята к печати 16.03.2022

Received 31.10.2021
Revision received 15.01.2022
Accepted 16.03.2022

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ПОПУЛЯЦИЙ И СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У ПЕРЕНЕСШИХ НОВУЮ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

И.А. Иванова, А.А. Труфанова, А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, А.К. Носков, О.С. Чемисова

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. SARS-CoV-2 может вызывать снижение количества лимфоцитов и их функциональной активности. У пациентов с COVID-19, особенно с тяжелым течением заболевания, регистрируют уменьшение количественного состава основных популяций лимфоцитов. Эти показатели не восстанавливаются длительное время после выздоровления. Однако до сих пор неизвестно, как долго продлятся количественные и качественные изменения в составе лимфоцитов, и влияет ли на этот процесс тяжесть перенесенной инфекции. Целью нашего исследования являлась оценка количественного и качественного состава основных популяций и субпопуляций лимфоцитов у перенесших новую коронавирусную инфекцию разной степени тяжести. Было обследовано 65 переболевших новой коронавирусной инфекцией. Средний возраст обследуемых составил $47,3 \pm 14,5$ года. Волонтеров распределили на три группы по степени тяжести перенесенной инфекции: бессимптомно ($n = 21$); средней степени тяжести ($n = 32$); в тяжелой форме ($n = 12$). Определяли относительное и абсолютное число Т-лимфоцитов ($CD3^+$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), цитотоксических лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$), натуральных киллеров ($CD3^-CD16^+CD56^+$), ТНК-лимфоцитов ($CD3^+CD16^-CD56^+$) и В-лимфоцитов ($CD45^+CD19^+$). Для подсчета процентного содержания лимфоцитов цельную кровь лизировали раствором OPTILYSE C (Beckman Coulter, США) и окрашивали моноклональными антителами $CD3^+$ -FITC/ $CD8^+$ -ECD/ $CD4^+$ -PC5/ $CD16^+CD56^+$ PE и $CD45^+$ -Pacific Blue/ $CD19^+$ -PC5 (Beckman Coulter, США). Цитофлюорометрию осуществляли на проточном цитофлюориметре «Navios™» (Beckman Coulter, США). Результаты наших исследований показали, что у бессимптомно переболевших новой коронавирусной инфекцией статистически значимых изменений относительного и абсолютного количества иммунокомпетентных клеток, по сравнению с контрольной группой, зарегистрировано не было. При средней степени тяжести заболевания выявлено снижение относительного и абсолютного содержания $CD3^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов, эти показатели восстанавливались до контрольных значений через полгода после выздоровления. У пациентов с тяжелой формой перенесенной инфекции наблюдалось уменьшение относительного и абсолютного количества Т-клеток и цитотоксических лимфоцитов. Эти значения оставались значительно ниже нормы в течение полугода и нормализовались только через 7–8 месяцев после выздоровления. Также у волонтеров этой группы было обнаружено уменьшение числа натуральных киллеров и ТНК-клеток. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что патологические изменения, касающиеся

Адрес для переписки:

Иванова Инна Александровна
344002, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40,
ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (863) 240-91-22. Факс: 8 (863) 267-02-23.
E-mail: ivanova_ia@antiplague.ru

Contacts:

Inna A. Ivanova
344002, Russian Federation, Rostov-on-Don,
Maxim Gorky str., 117/40, Rostov-on-Don Anti-Plague
Institute of Rosпотребнадзор.
Phone: +7 (863) 240-91-22. Fax: +7 (863) 267-02-23.
E-mail: ivanova_ia@antiplague.ru

Для цитирования:

Иванова И.А., Труфанова А.А., Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д.,
Носков А.К., Чемисова О.С. Количественный и качественный состав
популяций и субпопуляций лимфоцитов у перенесших новую
коронавирусную инфекцию разной степени тяжести // Инфекция
и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 505–510. doi: 10.15789/2220-7619-
QAQ-1818

Citation:

Ivanova I.A., Trufanova A.A., Filippenko A.V., Omelchenko N.D., Noskov A.K.,
Chemisova O.S. Quantitative and qualitative composition of lymphocyte
populations and subpopulations in patients with varying severity of a new
coronavirus infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet. 2022, vol. 12, no. 3, pp. 505–510. doi: 10.15789/2220-7619-
QAQ-1818

относительного и абсолютного количества основных популяций и субпопуляций лимфоцитов у переболевших COVID-19, зависят от тяжести перенесенного заболевания. У перенесших новую коронавирусную инфекцию в средней и тяжелой форме снижено число Т-лимфоцитов, цитотоксических лимфоцитов, натуральных киллеров, то есть популяций клеток, играющих решающую роль в эффективной противовирусной защите. Эти сведения могут быть полезны для расширения методических подходов к диагностике, лечению новой коронавирусной инфекции, а также мер по реабилитации перенесших ее лиц.

Ключевые слова: COVID-19, популяции и субпопуляции лимфоцитов, Т-лимфоциты, цитотоксические лимфоциты, натуральные киллеры.

QUANTITATIVE AND QUALITATIVE COMPOSITION OF LYMPHOCYTE POPULATIONS AND SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH VARYING SEVERITY OF A NEW CORONAVIRUS INFECTION

Ivanova I.A., Trufanova A.A., Filippenko A.V., Omelchenko N.D., Noskov A.K., Chemisova O.S.

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. SARS-CoV-2 can cause a decrease in the number of lymphocytes and their functional activity. In patients with COVID-19, especially with a severe course of the disease, a decrease in the quantitative composition of the main populations of lymphocytes is recorded. These indicators do not recover for a long time after recovery. However, it is still not known how long the quantitative and qualitative changes in the composition of lymphocytes will last and whether the severity of the infection affects this process. The aim of our study was to assess the quantitative and qualitative composition of the main populations and subpopulations of lymphocytes in patients with a new coronavirus infection of varying severity. 65 patients with a new coronavirus infection were examined. The average age of the subjects was 47.3 ± 14.5 years. The volunteers were divided into three groups according to the severity of the infection: asymptomatic ($n = 21$); moderate ($n = 32$); severe ($n = 12$). The relative and absolute number of T-lymphocytes ($CD3^+$), T-helper cells ($CD3^+CD4^+$), cytotoxic lymphocytes ($CD3^+CD8^+$), natural killers ($CD3^-CD16^+CD56^+$), TNK-lymphocytes ($CD3^+CD16^-CD56^+$) and B-lymphocytes ($CD45^+CD19^+$) were determined. To calculate the percentage of lymphocytes, whole blood was lysed with OPTILYSE C solution (Beckman Coulter, USA) and stained with monoclonal antibodies $CD3^+$ -FITC/ $CD8^+$ -ECD/ $CD4^+$ -PC5/ $CD16^+CD56^+$ PE and $CD45^+$ -Pacific Blue/ $CD19^+$ -PC5 (Beckman Coulter, USA). Cytofluorometry was performed on a flow cytofluorometer "Navios™" (Beckman Coulter, USA). The results of our studies showed that there were no statistically significant changes in the relative and absolute number of immunocompetent cells in asymptomatic patients with a new coronavirus infection, compared with the control group. With an average severity of the disease, a decrease in the relative and absolute content of $CD3^+$ and $CD8^+$ lymphocytes was revealed, these indicators were restored to control values six months after recovery. In patients with severe infection, there was a decrease in the relative and absolute number of T cells and cytotoxic lymphocytes. These values remained significantly below normal for six months and returned to normal only seven to eight months after recovery. Also, the volunteers of this group were found to have a decrease in the number of natural killers and TNK cells. Thus, the data obtained by us indicate that pathological changes concerning the relative and absolute number of the main populations and subpopulations of lymphocytes in patients with COVID-19 depend on the severity of the disease. The number of T-lymphocytes, cytotoxic lymphocytes, natural killer cells, that is, populations of cells that play a crucial role in effective antiviral protection, has been reduced in those who have undergone a new coronavirus infection in moderate and severe form. This information can be useful for expanding methodological approaches to the diagnosis, treatment of a new coronavirus infection, as well as measures for the rehabilitation of those who have suffered it.

Key words: COVID-19, populations and subpopulations of lymphocytes, T-lymphocytes, cytotoxic lymphocytes, natural killers.

Введение

Лимфоцитопения является типичным клиническим симптомом COVID-19 [11], причем снижение числа лимфоцитов предшествует развитию пневмонии с характерными изменениями в виде матового стекла в легких [7]. Данные клинического анализа крови более тысячи пациентов за первые два месяца эпидемии в Китае свидетельствуют о том, что при поступлении у 83,2% заболевших наблюдалась лимфоцитопения, у 36,2% обнаружена тромбоцитопения, а у 33,7% — лейкопения. Эти нарушения были более выраженными в случае тяжелого течения болезни по сравнению с инфекцией средней степени тяжести (96,1 и 80,4% — лим-

фоцитопения, 57,7 и 31,6% — тромбоцитопения, 61,1 и 8,1% — лейкопения соответственно) [5]. По другим источникам, лимфопения была выявлена у 63% [6] и 70,3% [16] пациентов, инфицированных новым коронавирусом в Ухане. Причем, наиболее выраженное снижение числа лимфоцитов наблюдалось у пациентов отделения интенсивной терапии [12].

Показано, что возбудитель COVID-19 действует главным образом на лимфоциты, и, в частности, на Т-клетки [14]. У многих пациентов, особенно с тяжелым течением заболевания, описано снижение количества Т-лимфоцитов [1], а также нарушение функции $CD4^+$, $CD8^+$ Т-клеток и натуральных киллеров (NK-клеток) [9]. SARS-CoV-2 может нарушать функцию Т-хелперов и регуля-

торных Т-лимфоцитов, вызывая раннюю гиперактивацию, за которой следует быстрое истощение цитотоксических Т-клеток [12, 18].

Перенесенная инфекция патологически влияет на лимфоциты и после клинического выздоровления и приводит к длительным дисфункциям, длящимся от 4 до 11 недель [17]. Число этих клеток после выздоровления постепенно повышается до нормального диапазона. Однако до сих пор неизвестно, как долго сохраняются количественные и качественные изменения в составе лимфоцитов и влияет ли на этот процесс тяжесть перенесенной инфекции.

Целью нашего исследования являлась оценка количественного и качественного состава основных популяций и субпопуляций лимфоцитов у перенесших новую коронавирусную инфекцию разной степени тяжести.

Материалы и методы

Было обследовано 65 переболевших новой коронавирусной инфекцией. Средний возраст обследуемых составил $47,3 \pm 14,5$ года. Волонтеров распределили на три группы по степени тяжести перенесенной инфекции: бессимптомно — 21 человек (7 мужчин, 14 женщин); средней степени тяжести — 32 человека (9 мужчин, 23 женщины); в тяжелой форме — 12 человек (3 мужчины, 9 женщин). Бессимптомное течение заболевания подтверждалось положительным тестом ПЦР/наличием специфических антител при отсутствии клинических симптомов. У волонтеров со средней степенью тяжести инфекции при положительном тесте ПЦР присутствовали симптомы ОРВИ без поражения легких. В группу с тяжелым течением заболевания были включены пациенты с положительным тестом ПЦР и поражением 30 и более процентов легких. Группу контроля составили 8 здоровых человек (женщин) в возрасте $35,5 \pm 3,46$ лет (ПЦР-тест отрицательный, специфические антитела отсутствуют, признаков ОРВИ не отмечено).

От всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Взятие крови осуществляли в утренние часы натощак путем пункции локтевой вены. Для иммунофенотипирования кровь забирали в пробирку VACUTAINER (BD), содержащую динатриевую соль ЭДТА.

Определяли относительное и абсолютное количество Т-лимфоцитов ($CD3^+$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), цитотоксических лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$), натуральных киллеров (НК) ($CD3^+CD16^+CD56^+$), ТНК-лимфоцитов ($CD3^+CD16^+CD56^+$) и В-лимфоцитов ($CD45^+CD19^+$) Для подсчета процентного содержания клеток цельную кровь лизировали раствором OPTILYSE C (Beckman Coulter, США) и окрашивали монокло-

нальными антителами $CD3^+$ -FITC/ $CD8^+$ -ECD/ $CD4^+$ -PC5/ $CD16^+CD56^+$ PE и $CD45^+$ -Pacific Blue/ $CD19^+$ -PC5 (Beckman Coulter, США). Цитофлюорометрию осуществляли на проточном цитофлюориметре «Navios™» (Beckman Coulter, США), оценивали не менее 10 тыс. событий.

Определяли общее число лейкоцитов (WBC) по формуле:

$$WBC = a \times 50 \times 10^6 / \text{л},$$

где a — число подсчитанных в камере Горяева лейкоцитов.

Расчет абсолютного количества лимфоцитов производили по формуле: $WBC \times (\%) / 100$.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007). Определяли среднее арифметическое значение \pm стандартное квадратичное отклонение. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни.

Результаты

Анализ результатов исследования относительного содержания основных популяций и субпопуляций лимфоцитов у бессимптомно переболевших новой коронавирусной инфекцией свидетельствует об отсутствии статистически значимых изменений количества иммунокомпетентных клеток по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

У пациентов, перенесших инфекцию средней степени тяжести, через 3–4 месяца после заболевания выявлено снижение относительного количества $CD3^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов, остальные популяции находились в пределах нормы. Через полгода после выздоровления число Т-клеток и цитотоксических лимфоцитов у волонтеров этой группы восстановилось до контрольных показателей.

Достоверные отличия от контрольных значений были выявлены при обследовании людей, перенесших COVID-19 в тяжелой форме. Эти изменения, по сравнению с контролем, характеризовались снижением относительного количества Т-лимфоцитов, особенно через 3–4 месяца после заболевания. Одновременно у волонтеров регистрировалось уменьшение числа $CD8^+$ -лимфоцитов, НК-клеток, а также Т-натуральных киллеров (ТНК) по сравнению с нормальными значениями. Следует отметить, что через полгода после перенесенного заболевания у обследуемых этой группы сохранялось низкое, относительно контроля, количество Т-клеток и цитотоксических лимфоцитов. Только через 7–8 месяцев эти нарушенные показатели нормализовались, относительное количество иммунокомпетентных клеток соответствовало возрастным критериям обследуемых.

Таблица 1. Относительное содержание (%) основных популяций и субпопуляций лимфоцитов в крови волонтеров, перенесших COVID-19
 Table 1. Relative content (%) of the main populations and subpopulations of lymphocytes in the blood of volunteers who have recovered from COVID-19

Популяции Populations	Контрольная группа Control group	Течение заболевания/Course of the disease											
		бессимптомное/asymptomatic (n = 21)				средней степени/moderate (n = 32)				тяжелое/severe (n = 12)			
		через 3-4 месяца after 3-4 months	через 5-6 месяцев after 5-6 months	через 7-8 месяцев after 7-8 months	через 3-4 месяца after 3-4 months	через 5-6 месяцев after 5-6 months	через 7-8 месяцев after 7-8 months	через 3-4 месяца after 3-4 months	через 5-6 месяцев after 5-6 months	через 7-8 месяцев after 7-8 months	через 3-4 месяца after 3-4 months	через 5-6 месяцев after 5-6 months	через 7-8 месяцев after 7-8 months
Т-лимфоциты (CD3⁺) T-lymphocytes (CD3 ⁺)	63,7±2,3	59,7±4,7	59,1±3,1	59,1±3,8	56,1±3,1*	58,8±4,2	58,9±3,8	50,3±3,4*	53,1±3,3*	57,8±3,1			
Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺) T-helper (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	42,6±2,2	41,7±2,2	42±2,1	40,9±2,0	36,4±2,0	37,1±3,7	38,5±3,7	35,2±3,1	36,1±3,3	41,8±2,3			
Т-цитотоксические (CD3⁺CD8⁺) Cytotoxic T cells (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	22,3±2,2	20,3±1,8	19,1±2,5	21,0±1,9	17,3±1,0*	20,7±2,8	21,4±2,0	15,4±2,0*	16,3±1,8*	18,9±2,5			
Натуральные киллеры (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) Natural killers (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	8,5±2,14	9,6±2,14	10,4±2,0	11,1±2,1	7,9±2,4	9,3±2,1	10,3±2,1	3,4±1,14**	4,6±1,4**	7,2±2,1			
Т-Натуральные киллеры (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) T-Natural killers (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	5,7±1,5	4,9±1,58	5,2±1,3	4,7±1,8	5,0±1,8	5,5±1,58	5,2±1,8	2,5±1,58**	4,5±1,58	5,5±1,2			
В-лимфоциты (CD19⁺) B-lymphocytes (CD19 ⁺)	9,0±1,5	8,5±2,5	7,5±1,5	8,0±2,1	7,8±2,0	7,7±1,2	7,1±1,5	6,9±3,5	8,0±1,5	7,5±1,9			

Примечание. * — достоверное отличие от нормы (p < 0,05); ** — достоверное отличие от показателя в эти сроки при заболевании средней тяжести (p < 0,05).
 Note. * — significant difference from the norm (p < 0,05); ** — significant difference compared to that of any timepoints in moderate disease (p < 0,05).

Таблица 2. Абсолютное содержание (x 10⁹/л) основных популяций и субпопуляций лимфоцитов в крови пациентов, перенесших COVID-19
 Table 2. The absolute content (x 10⁹/l) of the main populations and subpopulations of lymphocytes in the blood of patients who have recovered from COVID-19

Популяции Populations	Контрольная группа Control group	Течение заболевания/Course of the disease											
		бессимптомное/asymptomatic (n = 21)				средней степени/moderate (n = 32)				тяжелое/severe (n = 12)			
		через 3-4 месяца after 3-4 months	через 5-6 месяцев after 5-6 months	через 7-8 месяцев after 7-8 months	через 3-4 месяца after 3-4 months	через 5-6 месяцев after 5-6 months	через 7-8 месяцев after 7-8 months	через 3-4 месяца after 3-4 months	через 5-6 месяцев after 5-6 months	через 7-8 месяцев after 7-8 months	через 3-4 месяца after 3-4 months	через 5-6 месяцев after 5-6 months	через 7-8 месяцев after 7-8 months
Т-лимфоциты (CD3⁺) T-lymphocytes (CD3 ⁺)	1,21±0,03	1,05±0,1	1,14±0,06	1,13±0,08	0,97±0,07*	1,1±0,05	1,12±0,08	0,77±0,04**	0,81±0,1**	1,14±0,06			
Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺) T-helper (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	1,0±0,04	0,91±0,06	1,0±0,06	1,1±0,03	0,92±0,08	1,02±0,06	1,0±0,06	0,89±0,05	0,86±0,07	1,0±0,08			
Т-цитотоксические (CD3⁺CD8⁺) Cytotoxic T cells (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	0,45±0,02	0,46±0,02	0,45±0,03	0,45±0,06	0,31±0,04*	0,39±0,03	0,40±0,06	0,30±0,04*	0,32±0,03*	0,41±0,06			
Натуральные киллеры (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) Natural killers (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	0,21±0,04	0,22±0,04	0,19±0,06	0,2±0,04	0,19±0,02	0,2±0,03	0,19±0,04	0,1±0,02**	0,2±0,07	0,19±0,08			
Т-Натуральные киллеры (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) T-Natural killers (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	0,09±0,03	0,08±0,03	0,09±0,02	0,09±0,03	0,07±0,02	0,08±0,02	0,09±0,04	0,06±0,02	0,07±0,02	0,09±0,02			
В-лимфоциты (CD19⁺) B-lymphocytes (CD19 ⁺)	0,21±0,03	0,19±0,02	0,21±0,05	0,20±0,02	0,18±0,06	0,19±0,05	0,19±0,03	0,2±0,06	0,18±0,07	0,18±0,03			

Примечание. * — достоверное отличие от нормы (p < 0,05); ** — достоверное отличие от показателя в эти сроки при заболевании средней тяжести (p < 0,05).
 Note. * — reliable difference from the norm (p < 0,05); ** — significant difference compared to that of any timepoints in moderate disease (p < 0,05).

Результаты оценки показателей у перенесших инфекцию в средней и тяжелой форме не выявили достоверных отличий по отношению к содержанию CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD19⁺-лимфоцитов. Достоверное, по сравнению с аналогичными показателями у волонтеров, перенесших заболевание в средней форме, уменьшение числа NK и TNK-клеток было зарегистрировано нами у тяжелопереболевших, особенно через 3–4 месяца после выздоровления.

Анализ абсолютного количества лимфоцитов продемонстрировал снижение, по сравнению с контрольной группой, CD3⁺- и CD8⁺-клеток у переболевших COVID-19 в средней форме (табл. 2). Эти показатели нормализовались только через полгода после выздоровления.

Наиболее выраженная Т-лимфоцитопения, сохраняющаяся до шести месяцев, наблюдалась у пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции. Также в этой группе было снижено абсолютное число CD8⁺-лимфоцитов. Эти показатели достигли контрольных значений только через 7–8 месяцев после перенесенного заболевания. Также у волонтеров, перенесших COVID-19 в тяжелой форме, регистрировалось уменьшение натуральных киллеров, нормальное количество которых восстанавливалось через 5–6 месяцев после выздоровления.

Таким образом, при оценке количественного и качественного состава основных популяций и субпопуляций лимфоцитов у перенесших новую коронавирусную инфекцию разной степени тяжести выявлено, что SARS-CoV-2 снижает относительное и абсолютное количество Т-клеток, цитотоксических лимфоцитов, натуральных киллеров, то есть популяций клеток, играющих решающую роль в эффективной противовирусной защите.

Обсуждение

Накопленные в настоящее время данные свидетельствуют о том, что у пациентов с COVID-19 нарушены многие лабораторные показатели, и некоторые из них могут являться значимыми предикторами неблагоприятных клинических исходов. Таким фактором, наряду с увеличением количества лейкоцитов и нейтрофилов, является снижение числа лимфоцитов [8]. Лимфоцитопения описана как типичный клинический симптом у пациентов с COVID-19 многими исследователями, однако механизмы и причины ее возникновения еще остаются не до конца раскрытыми. Доказано, что подобно другим вирусам, SARS-CoV-2 мо-

жет вызывать снижение количества лимфоцитов и их функциональной активности несколькими способами: первый — нарушение лимфопоэза, второй — апоптоз и разрушение этих клеток, третий — снижение числа циркулирующих лимфоцитов за счет прикрепления их к сосудистому эндотелию [13]. У пациентов с COVID-19, особенно в тяжелых случаях, регистрируется снижение количества и нарушение функции Т-хелперов, а также цитотоксических лимфоцитов и натуральных киллеров [4, 10], то есть популяций, имеющих решающее значение для контроля внутриклеточных инфекций. Эти показатели не восстанавливаются в течение нескольких месяцев, что свидетельствует о том, что SARS-CoV-2 достаточно сильно поражает лимфоциты, вызывая дисфункции даже после клинического выздоровления [17], а степень этих изменений коррелирует с тяжестью инфекционного процесса [9, 15].

Результаты наших исследований показали, что у бессимптомно переболевших новой коронавирусной инфекцией статистически значимых изменений относительного и абсолютного количества иммунокомпетентных клеток, по сравнению с контрольной группой, зарегистрировано не было. При средней степени тяжести заболевания выявлено снижение относительного и абсолютного содержания CD3⁺- и CD8⁺-лимфоцитов. Эти показатели восстанавливались до контрольных значений через полгода после выздоровления. У пациентов с тяжелой формой перенесенной инфекции наблюдалось уменьшение относительного и абсолютного количества Т-клеток и цитотоксических лимфоцитов. Эти значения оставались значительно ниже нормы в течение полугодия и нормализовались только через 7–8 месяцев после выздоровления. Также у волонтеров этой группы было обнаружено уменьшение числа натуральных киллеров и TNK-клеток. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей, свидетельствующих о том, что количество лимфоцитов, особенно Т-клеток, у перенесших COVID-19 значительно снижено [2, 11, 14]. У пациентов, особенно в тяжелых случаях, регистрировалось также уменьшение CD4⁺-, CD8⁺-лимфоцитов, NK-клеток, сопровождающееся функциональным нарушением [4, 9, 10, 17]. Полученные в ходе проведенных нами исследований сведения могут быть полезны для расширения методических подходов к диагностике, лечению новой коронавирусной инфекции, а также мер по реабилитации перенесших ее лиц.

Список литературы/References

1. Chen Z., Wherry E.J. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, vol. 20, pp. 529–536. doi: 10.1038/s41577-020-0402-6
2. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., Chen L., Li M., Liu Y., Wang G. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.*, 2020, vol. 1, no. 11: 827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827

3. Fan B.E., Chong V.C., Chan S.S. W., Lim G., Lim K.G.E., Tan G.B., Mucheli S.S., Kuperan P., Ong K. Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection. *Am. J. Hematol.*, 2020, vol. 95, no. 6, pp. E131–E134. doi: 10.1002/ajh.25774
4. Ganji A., Farahani I., Khansarinejad B., Ghazavi A., Mosayebi G. Increased expression of CD8 marker on T-cells in COVID-19 patients. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2020, vol. 83: 102437. doi: 10.1016/j.bcmd.2020.102437
5. 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., Du B., Li L.-J., Zeng G., Yuen K. Y., Chen R.-C., Tang C.-L., Wang T., Chen P.-Y., Xiang J., Li S.-Y., Wang J.-L., Liang Z.-J., Peng Y.-X., Wei L., Liu Y., Hu Y.-H., Peng P., Wang J.-M., Liu J.-Y., Chen Z., Li G., Zheng Z.-J., Qiu S.-Q., Luo J., Ye C.-J., Zhu S.-Y., Zhong N.-S. Clinical characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 382, no. 18, pp. 1708–1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032
6. 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
7. Lin L., Lu L., Cao W., Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection—a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg. Microb. Infect.*, 2020, vol. 9, no. 1, pp. 727–732. doi: 10.1080/22221751.2020.1746199
8. Lippi G., Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2020, vol. 25, no. 58 (7), pp. 1131–1134. doi: 10.1515/cclm-2020-0198
9. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., Li W., Tong Q., Yi J., L. Zhao, Xiong L., Guo C., Tian J., Luo J., Yao J., Pang R., Shen H., Peng C., Liu T., Zhang Q., Wu J., Xu L., Lu S., Wang B., Weng Z., Han C., Zhu H., Zhou R., Zhou H., Chen X., Ye P., Zhu B., Wang L., Zhou W., He S., He Y., Jie S., Wei P., Zhang J., Lu Y., Wang W., Zhang L., Li L., Zhou F., Wang J., Dittmer U., Lu M., Hu Y., Yang D., Zheng X. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *eBioMedicine*, 2020, vol. 55: 102763. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102763
10. Manickam C., Sugawara S., Reeves R.K. Friends or foes? The knowns and unknowns of natural killer cell biology in COVID-19 and other coronaviruses in July 2020. *PLoS Pathog.*, 2020, vol. 16, no. 8: e1008820. doi: 10.1371/journal.ppat.1008820
11. Peng J., Qi D., Yuan G., Deng X., Mei Y., Feng L., Wang D. Diagnostic value of peripheral hematologic markers for coronavirus disease 2019 (COVID-19): a multicenter, cross-sectional study. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2020, vol. 34, no. 10: e23475. doi: 10.1002/jcla.23475
12. Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y., Xie C., Ma K., Shang K., Wang W., Tian D.-S., Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y., Xie C., Ma K., Shang K., Wang W., Tian D.-S. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 71, no. 15, pp. 762–768. doi: 10.1093/cid/ciaa248.
13. Rokni M., Ghasemi V., Tavakoli Z. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: comparison with SARS and MERS. *Rev. Med. Virol.*, 2020, vol. 30, no. 3: e2107. doi: 10.1002/rmv.2107
14. Vaninov N. In the eye of the COVID-19 cytokine storm. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, vol. 20, no. 5: 277. doi: 10.1038/s41577-020-0305-6
15. Wan S., Yi Q., Fan S., Lv J., Zhang X., Guo L., Lang C., Xiao Q., Xiao K., Yi Z., Qiang M., Xiang J., Zhang B., Chen Y., Gao C. Relationships among lymphocyte subsets, cytokines, and the pulmonary inflammation index in coronavirus (COVID-19) infected patients. *Br. J. Haematol.*, 2020, vol. 189, no. 3, pp. 428–437. doi: 10.1111/bjh.16659
16. 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: 1061. doi: 10.1001/jama.2020.1585
17. Yang J., Zhong M., Zhang E., Hong K., Yang Q., Zhou D., Xia J., Chen Y.-Q., Sun M., Zhao B., Xiang J., Liu Y., Han Y., Zhou X., Huang C., Shang Y., Yan H. Broad phenotypic alterations and potential dysfunctions of lymphocytes in COVID-19 recovered individuals. *J. Mol. Cell Biol.*, 2021, vol. 13, no. 3, pp. 197–209. doi: 10.1093/jmcb/mjab014
18. Zheng H.-Y., Zhang M., Yang C.-X., Zhang N., Wang X.-C., Yang X.-P., Dong X.-Q., Zheng Y.-T. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, vol. 17, no. 5, pp. 541–543. doi: 10.1038/s41423-020-0401-3

Авторы:

Иванова И.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник с врио зав. лабораторией иммунологии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Труфанова А.А., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Филиппенко А.В., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Омельченко Н.Д., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Носков А.К., директор ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Чемисова О.С., ио зав. лабораторией «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия.

Authors:

Ivanova I.A., PhD (Biology), Leading Researcher with Acting Head of the Immunology Laboratory, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Trufanova A.A., Junior Researcher, Laboratory of Immunology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Filippenko A.V., Junior Researcher, Laboratory of Immunology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Omelchenko N.D., PhD (Medicine), Senior Researcher Laboratory of Immunology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Noskov A.K., Director, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Chemisova O.S., Acting Head of the Laboratory “Collection of Pathogenic Microorganisms” Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Поступила в редакцию 09.11.2021
Отправлена на доработку 15.01.2022
Принята к печати 25.03.2022

Received 09.11.2021
Revision received 15.01.2022
Accepted 25.03.2022

EVALUATION OF SERUM LEVELS OF IL-6 AND ADIPONECTIN IN COVID-19 PATIENTS AND THEIR RELATIONSHIP WITH DISEASE SEVERITY

M. Norouziyan, K. Sharifi-Sarasiabi, M. Najafi-Asl, M. Hassani Azad, H. Estabraghnia Babaki

Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

Abstract. *Background.* The SARS-CoV-2 pandemic has prompted researchers around the world to identify risk factors associated with disease severity and mortality. Results suggest that COVID-19 mortality might be due to a ‘cytokine storm’ involving IL-6, and that obesity can be considered a risk factor for COVID-19 prevalence, severity, and mortality. The current study aimed to evaluate the serum levels of IL-6 and adiponectin in patients and their relationship with disease progression. *Materials and methods.* ELISA was used to assess the levels of IL-6 and adiponectin in serum samples from a control group and from patients with COVID-19 at the time of admission to ICU or non-ICU wards. The results were analyzed using the Mann–Whitney and Spearman tests. *Results.* Mean serum levels of adiponectin in patients admitted to ICU (10.18 ± 15.4 ng/ml) were significantly higher than patients admitted to non-ICU wards (3.14 ± 3 ng/ml, $p = 0.001$). Mean serum IL-6 levels showed a similar pattern, however the difference was not statistically significant ($p = 0.18$). In addition, a significant direct correlation was observed between adiponectin expression and IL-6 ($R = 0.2$, $p = 0.03$). *Conclusion.* The results of this study show that serum levels of adiponectin in COVID-19 patients with severe lung involvement were significantly higher than those with less lung involvement. This finding is of high importance mainly due to the critical role of the lungs in adiponectin signaling, and as a result, adiponectin disorders may be associated with pulmonary complications in COVID-19 patients.

Key words: COVID-19, IL-6, adiponectin, intensive care unit, disease severity, lung involvement.

ОЦЕНКА СЫВОРОТОЧНЫХ УРОВНЕЙ IL-6 И АДИПОНЕКТИНА У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 И ИХ СВЯЗИ С ТЯЖЕСТЬЮ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Норузьян М., Шарифи-Сарасиabi К., Наджафи-Асл М., Хассани Азад М., Эстабрагния Бабаки Х.

Гормозганский университет медицинских наук, Бендер-Аббас, Иран

Резюме. *История вопроса.* Пандемия инфекции SARS-CoV-2 побудила исследователей во всем мире выявить факторы риска, связанные с тяжестью заболевания и смертностью от него. Результаты показывают, что смертность от COVID-19 может быть связана с «цитокиновым штормом» с участием IL-6 и что ожирение можно рассматривать как фактор риска распространенности, тяжести и смертности от COVID-19. Настоящее исследование было направлено на оценку уровней IL-6 и адипонектина в сыворотке у пациентов и их связи с прогрессированием COVID-19. *Материалы и методы.* ИФА использовался для оценки уровней IL-6

Адрес для переписки:

Марзи Норузьян
Иран, Бендер Аббас, а/я 7919693116.
Тел./факс: +98763366367.
E-mail: marzieh.norouzi@gmail.com

Contacts:

Marzieh Norouziyan
Iran, Bandar Abbas, P.O. Box: 7919693116.
Phone/fax: +98763366367.
E-mail: marzieh.norouzi@gmail.com

Для цитирования:

Норузьян М., Шарифи-Сарасиabi К., Наджафи-Асл М., Хассани Азад М., Эстабрагния Бабаки Х. Оценка сывороточных уровней IL-6 и адипонектина у пациентов с COVID-19 и их связи с тяжестью заболевания // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 511–518. doi: 10.15789/2220-7619-EOS-1783

Citation:

Norouziyan M., Sharifi-Sarasiabi K., Najafi-Asl M., Hassani Azad M., Estabraghnia Babaki H. Evaluation of serum levels of IL-6 and adiponectin in COVID-19 patients and their relationship with disease severity // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 511–518. doi: 10.15789/2220-7619-EOS-1783

This research was funded by the Hormozgan University of Medical Sciences (IR.HUMS.REC.1399.195).

и адипонектина в образцах сыворотки контрольной группы и пациентов с COVID-19 во время поступления в отделение интенсивной терапии или в обычные инфекционные отделения. Результаты анализировали с использованием тестов Манна–Уитни и Спирмена. *Результаты.* Средние уровни адипонектина в сыворотке у пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии (10.18 ± 15.4 нг/мл), были значительно выше, чем у пациентов, поступивших в обычные инфекционные отделения (3.14 ± 3 нг/мл, $p = 0.001$). Средние уровни IL-6 в сыворотке были сопоставимы и не имели статистически достоверных различий ($p = 0.18$). Кроме того, отмечена достоверная прямая корреляция между уровнем в сыворотке адипонектина и IL-6 ($R = 0.2$, $p = 0.03$). *Выводы.* Результаты настоящего исследования показали, что уровни адипонектина в сыворотке у пациентов с COVID-19 с тяжелым поражением легких были значительно выше, чем у пациентов с меньшей степенью поражения легких. Полученные данные имеют большое значение главным образом из-за критической роли легких в передаче сигналов от адипонектина, и, как следствие, нарушения в системе адипонектина могут быть связаны с легочными осложнениями у пациентов с COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, IL-6, адипонектин, отделение реанимации, тяжесть заболевания, поражение легких.

Introduction

COVID-19 is a recently discovered infectious disease caused by a new coronavirus called SARS-CoV-2 [16, 40]. In addition to older age, obesity has been revealed as one of the most important risk factors contributing to severe forms of COVID-19 [28]. In a retrospective study of 85 patients with COVID-19, obesity was reported as a risk factor for admission to the intensive care unit [34]. Although the mechanisms have yet to be elucidated, studies suggest that obesity can be considered a risk factor for acute respiratory failure [18], and that obesity might be associated with COVID-19 severity [12]. On the other hand, in people with lung injury, obesity has shown to be associated with better outcomes, a phenomenon called the “obesity paradox” [48].

Adipose tissue is active in the processes of inflammation and immune response due to secretion of substances called “adipocytokines” such as adiponectin, leptin, TNF α , IL-6, complement factors, growth factors, and adhesive molecules [44]. Therefore, abnormal expression of adipocytokines secreted from adipose tissue may contribute to the “cytokine storm” that characterizes severe COVID-19 forms. Several studies have shown the anti-inflammatory role of adiponectin in lung diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), emphysema, and lung cancer [3, 24]. The anti-inflammatory function of adiponectin has been shown in studies on lung cells *in vitro* [8, 22].

Mouse models with adiponectin deficiency also develop pulmonary dysfunction and systemic inflammation [29]. In fact, adiponectin has been shown to: decrease the proliferation of innate and acquired immune cells, as well as suppress the production of inflammatory mediators such as IL-6, IL-2, and TNF α ; and to increase the production of immunosuppressive cytokines such as IL-10 [1, 20]. On the other hand, a significant association has also been reported between decreased blood levels of adiponectin and increased prevalence of cardiovascular disorders and obesity-related diabetes. Decreased levels of adi-

ponectin have also been associated with increased IL-6 levels [17, 19, 23].

However, recent studies suggest that adiponectin may also stimulate the production of inflammatory agents, and that elevated adiponectin levels might be associated with increased inflammation in inflammatory diseases such as autoimmune disorders. For example, elevated levels of adiponectin in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis have shown to be directly related to serum CRP levels [25, 32]. Adiponectin has also been reported to increase the production of IL-6 in human synovial fibroblasts by activating the AMPK, p38MAPK, and NF- κ B signaling pathways [37]. In type I diabetes, elevated levels of adiponectin have been associated with increased levels of IL-6 and CRP [11]. A direct relationship has also been described between elevated serum adiponectin levels and viral load and systemic inflammation in patients with chronic hepatitis infection [6, 38].

Since the interaction between adiponectin and inflammatory factors is not yet fully understood, further studies are needed especially in the context of COVID-19 infection causing pulmonary complications, such as pneumonia and, in the most severe cases, ARDS [14]. The results of a study involving 150 COVID-19 patients to determine the clinical predictors of disease mortality showed that in deceased patients, serum IL-6 levels were higher than in discharged patients; this implies that cytokine storm may be the leading cause of death in COVID-19 patients [30]. Therefore, several clinical trials have been conducted to find a useful treatment to reduce cytokine levels [21]. Only one study investigated the link between adiponectin and inflammatory cytokines in COVID-19 patients with acute respiratory distress. Blot et al. reported a negative association between adiponectin and IL-6 in COVID-19 patients [4]. Since reports on the relationship between inflammatory cytokines and adiponectin in COVID-19 patients are limited, this study aimed to evaluate the serum levels of inflammatory cytokine IL-6 and adiponectin in patients with COVID-19 and to elucidate their relationship with disease progression.

Materials and methods

Study population. In this study, serum samples from 80 patients with COVID-19, admitted to ICU or non-ICU wards of Shahid Mohammadi Hospital of Bandar Abbas, were collected on the first day of hospitalization. None of the patients received COVID-19 hospital treatment before sampling (use of medications by patients at home was however unavoidable). Serum samples were divided into appropriate tubes and kept at -70°C until ELISA. Prior to sampling, a written informed consent was obtained from each patient. Definitive diagnosis of COVID-19 was based on positive PCR and lung involvement through chest CT scan. Control samples of healthy volunteers were also included.

All procedures performed in the current study were approved by the Ethics Committee of Hormozgan University of Medical Sciences (IR.

HUMS.REC.1399.195) in accordance with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments.

ELISA. Serum levels of IL-6 and adiponectin were determined using commercial ELISA kits, based on the manufacturer's instructions (ZellBio, Germany). The sensitivities of the IL-6 and adiponectin assays were 30–960 and 2–64 mg/l, respectively. Serum samples and standards were added to wells of plates containing antibodies against IL-6 or adiponectin. After incubation and washing, HRP-conjugated antibody was added to the plates. Following incubation and washing, substrate was then added. In the next step, enzyme inhibitor solution was added, and plates were read by ELISA reader at a wavelength of 450 nm.

Statistical analysis. Data were analyzed using the Mann–Whitney and Spearman non-parametric statistical tests with SPSS software version 16. Significance was designated as $p < 0.05$.

Table 1. Demographics and baseline characteristics of COVID-19 patients

	All patients (n = 80)	ICU care (n = 40)	Non-ICU care (n = 40)	Healthy controls (n = 5)	p value
Characteristics					
Age	58.5±1.7 (24–94)	60.2±1.7 (26–88)	56.8±1.7 (24–94)	44.2±18.3 (27–75)	0.33
Sex					
Male	39 (48.8%)	20 (50%)	19 (47.5%)	2 (40%)	–
Female	41 (51.2%)	20 (50%)	21 (52.5%)	3 (60%)	–
Diabetes	30 (37.5%)	14 (35%)	16 (40%)	–	0.64
Cardiovascular disease	26 (32.5%)	12 (30%)	14 (35%)	–	0.63
Hypertension	32 (40%)	19 (47.5%)	13 (32.5%)	–	0.17
Signs and symptoms					
Fever	40 (50%)	17 (42.5%)	23 (57.5%)	–	0.18
Cough	42 (52.5%)	20 (50%)	22 (55%)	–	0.65
Dyspnea	1 (1.2%)	0	1 (2.5%)	–	0.31
Respiratory distress	62 (77%)	32 (80%)	30 (75%)	–	0.59
Myalgia	20 (25%)	11 (27.5%)	9 (22.5%)	–	0.60
Headache	9 (11.2%)	5 (12.5%)	4 (10%)	–	0.72
Vertigo	8 (10%)	5 (12.5%)	3 (7.5%)	–	0.45
Fatigue	14 (17.5%)	7 (17.5%)	7 (17.5%)	–	1.00
Anorexia	11 (13.8%)	5 (12.5%)	6 (15%)	–	0.74
Loss of taste	1 (1.2%)	0	1 (2.5%)	–	0.31
Diarrhea	9 (11.2%)	3 (7.5%)	6 (15%)	–	0.29
Vomiting	4 (5%)	1 (2.5%)	3 (7.5%)	–	0.30
Chest pain	5 (6.2%)	2 (5%)	3 (7.5%)	–	0.64
Death	39 (48.8%)	32 (80%)	7 (17.5%)	–	< 0.0001
IL-6, pg/ml	45.3±2.7 (3–155.5)	48.7±2.7 (10–155.5)	41.9±2.7 (3–135)		0.18
Adiponectin, µg/ml	6.7±11.6 (0.0–84.8)	10.18±15.4 (0.8–84.8)	3.14±3 (0.0–14.5)		0.001

Notes. Data are mean±SD (standard deviation), with n (%), or n/N (%), where N is the total number of patients with available data. p values comparing ICU care and non-ICU care are from Mann–Whitney U test. COVID-19 — coronavirus disease 2019. ICU — intensive care unit.

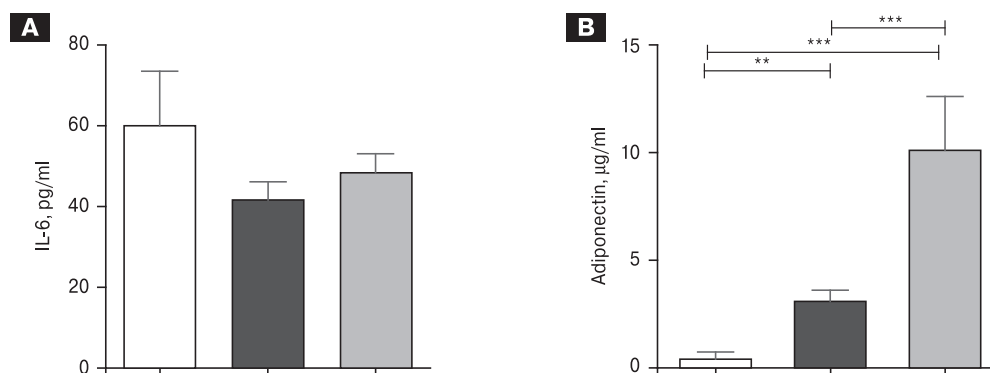


Figure 1. Comparison of serum IL-6 and adiponectin levels in COVID-19 patients admitted to ICU wards, non-ICU wards, and control group

Notes. Eighty patients were divided into two groups: ICU hospitalized ($n = 40$) and non-ICU ($n = 40$). IL-6 (A) and adiponectin (B) levels were compared between the two groups. The values in the figure are expressed as Mean \pm SEM. *** p value < 0.001.

Results

The study population involved: 80 patients (40 admitted to the ICU, and 40 admitted to non-ICU wards); and 5 healthy controls. All groups were matched according to demographic variables, such as age and sex. A total of 41 men and 44 women were studied. The mean age of the study population was 28.45 ± 5.83 years. The mean ages were: 60.2 ± 1.7 in the ICU group; 56.8 ± 1.7 in the non-ICU patients; and 44.2 ± 18.3 years in the control group. There was no difference between groups according to different variables (Table 1). Detailed information on the study population is presented in Table 1. However, due to a lack of information on patient weights and heights, we were not able to compare groups in terms of body mass index (BMI).

Serum IL-6 levels. The means (\pm standard deviation) of IL-6 level in ICU and non-ICU patients were 48.7 ± 2.7 and 41.9 ± 2.7 pg/ml, respectively, which was not statistically significant nor in control subjects

(Fig. 1) ($p = 0.18$). IL-6 expression in young people (less than 45 years) admitted to the ICU was significantly higher than young people admitted to the non-ICU wards ($p = 0.02$). In ICU hospitalized patients with diabetes and hypertension, IL-6 levels were significantly higher compared to patients without underlying disease ($p = 0.01$, $p = 0.02$, respectively).

Serum adiponectin levels. ICU and non-ICU hospitalized patients had higher adiponectin levels compared to the control group ($p < 0.001$ and $p = 0.002$, respectively). Moreover, the mean serum level of adiponectin in ICU patients was significantly higher than in non-ICU patients (10.4 ± 15.4 and 3.1 ± 3 mg/l, respectively, $p = 0.001$) (Fig. 1), and it was significant in both age groups (younger $p = 0.003$, older $p = 0.03$). However, significant differences in adiponectin level in patients with comorbidities, compared to those without comorbidities, were not seen. The results of our study show that there was a significant positive relationship between IL-6 and adiponectin in COVID-19 patients ($p = 0.03$, $R = 0.232$) (Fig. 2).

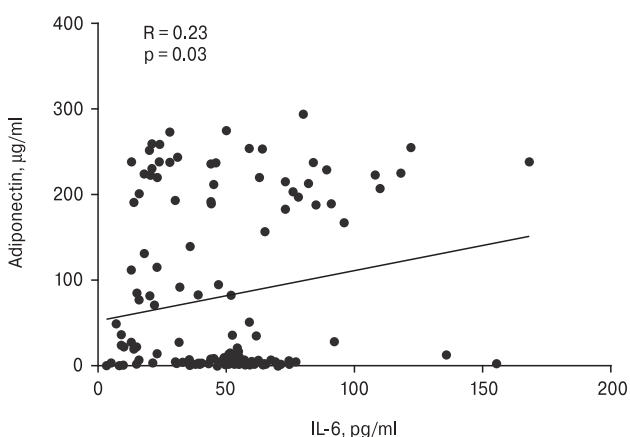


Figure 2. Spearman's correlation between serum levels of IL-6 and adiponectin in COVID-19 patients (n = 80)

Discussion

Due to mortality (5–7%) and high ICU admission (9–11%) among patients infected with SARS-CoV-2 [2], all necessary measures should be taken to control the COVID-19 pandemic. Since COVID-19 can cause mild illness, or a very acute respiratory syndrome leading to release of proinflammatory cytokines including IL-6 and TNF α [30], and considering obesity as a potential risk factor for developing serious illness with SARS-CoV-2 infection [34], a possible mechanism through abnormal secretion of adipokines via adipose tissue can be proposed. Therefore, in this study, serum levels of IL-6 and adiponectin (the most plentiful adipokine released by adipose tissue) in COVID-19 patients, and their relationship with disease severity, were evaluated. Our study showed that hospitalized COVID-19

patients had significantly elevated serum adiponectin levels compared to healthy controls. Moreover, adiponectin levels were significantly higher in ICU patients compared to patients admitted to non-ICU wards; this implies a possible relationship between adiponectin and disease severity.

Serum IL-6 levels were also higher in the ICU group compared to the non-ICU group. The difference, however, was not statistically significant. It should be noted that the small size of our study population (80 individuals), along with self-medication at home and arbitrary consumption of anti-inflammatory drugs (such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) likely influenced IL-6 expression. NSAIDs are well known as immunoregulators, but their mechanisms of action have not been fully determined. Previous studies have shown that NSAIDs down-regulate IL-6 production at the mRNA and protein levels in human PBMCs, T-cell clones, and chondrocytes [27, 39]. Moreover, in a mouse model of SARS-CoV-2 infection, it was shown that NSAID treatment decreased the production of a subset of inflammatory cytokines upregulated by infection, including IL-6 [3].

Adiponectin is an adipokine secreted in large quantities, and almost exclusively, from adipose tissue. As mentioned, protective functions of adiponectin have been shown in experimental disease models, such as atherosclerosis, diabetes, and inflammation [44]. Animal and *in vitro* studies have shown that adiponectin inhibits the production of proinflammatory cytokines, including TNF α and IL-6 [1, 20, 45], while increasing anti-inflammatory mediators such as IL-10 [43]. Despite these observations, several studies have shown that adiponectin exerts proinflammatory effects under certain conditions [10, 35]. Several clinical studies have proposed a possible relationship between adiponectin levels and mortality rates in patients with acute dyspnea and cardiovascular diseases [9, 33].

In a large cross-sectional study of patients with pneumonia or sepsis admitted to intensive care, Waki et al. found that higher concentrations of systemic adiponectin in the early days of the disease were associated with low survival rates [41]. It has been proposed that higher concentrations of adiponectin on the first day of illness might indicate an inefficient response to disease induced stress, suggesting that an initial drop in adiponectin levels and subsequent return to baseline could be beneficial for patient survival. According to this hypothesis, the deceased patients in this study showed a slight increase in adiponectin levels between day 1 and day 6 of hospitalization [41]. Similarly, in the present study, the adiponectin levels in patients admitted to intensive care on the first day of hospitalization were higher compared to patients admitted to non-ICU wards. However, adiponectin might exert different effects on critical illnesses in different time periods. Therefore, further longitudinal studies are needed to evaluate the concentra-

tions of adiponectin in different time periods during the course of disease to determine its function in disease progression.

On the other hand, adiponectin has been shown to exhibit pro-inflammatory and anti-inflammatory activities [7]. Therefore, it could exert different effects under different inflammatory conditions. Patients with chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, SLE, type I diabetes, and inflammatory bowel disease, had elevated adiponectin levels compared with patients with metabolic disorders [13, 31, 32, 46]. These conditions point to a clear inconsistency, which is characterized by the presence of large quantities of adiponectin in an inflammatory context. In these patients, adiponectin levels are positively correlated to inflammatory markers. In addition, pro-inflammatory functions of adiponectin have been reported in the synovium of the joints and in the epithelium of the large intestine.

Adiponectin has been shown to have pro- and anti-inflammatory properties, however the effect of total adiponectin in chronic inflammatory diseases, such as autoimmune disorders, is controversial. It is worth mentioning that adiponectin consists of three isoforms: low molecular weight (trimers); intermediate molecular weight (hexamers); and high molecular weight (HMW or multimers) [42]. These isoforms may differ in their biological activities. For example, the HMW isoform is the most biologically active form in the regulation of insulin resistance [26]. For this reason, further studies are needed to investigate the possible roles of adiponectin isoforms in inflammatory responses.

Adiponectin and its receptors are expressed in different lung cells [36, 47]. Moreover, pulmonary endothelial cells contribute to transfer of adiponectin from the circulation into the lungs by expressing the cadherin molecule [15]. Therefore, the lung could be a target organ for adiponectin signaling, and as a result, adiponectin disorders might be associated with pulmonary complications in COVID-19 patients. However, further studies are needed to determine the role and regulation of adiponectin in inflammation and COVID-19 patients. Investigation of adiponectin function and regulation, along with its possible pleiotropy, would help develop new methodologies for diagnosis and management of disease. The limitations of the present study include: a lack of BMI data; the small sizes of the patient and healthy control groups; and no evaluation of adiponectin isoforms. These limitations should be considered in future studies.

Altogether, the present study provides valuable data on the associations between adiponectin level, IL-6 level, and disease severity in COVID-19 patients with acute respiratory distress. However, the relationship between adiponectin and proinflammatory agents is still unclear. In addition, the precise anti-inflammatory or proinflammatory functions of systemic and local adiponectin, and their asso-

ciation with IL-6 expression, need to be elucidated in various diseases including COVID-19.

of Medical Sciences and also the patient participants in the study.

Acknowledgements

The authors acknowledge the efforts of staff at hospitals affiliated with the Hormozgan University

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Ajuwon K.M., Spurlock M.E. Adiponectin inhibits LPS-induced NF- κ B activation and IL-6 production and increases PPAR γ 2 expression in adipocytes. *Am. Physiol J. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2005, vol. 288, no. 5, pp. R1220–R1225. doi: 10.1152/ajpregu.00397.2004
2. Baud D., Qi X., Nielsen-Saines K., Musso D., Pomar L., Favre G. Real estimates of mortality following COVID-19 infection. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 7: 773. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30195-X
3. Bianco A., Mazzarella G., Turchiarelli V., Nigro E., Corbi G., Scudiero O., Sofia M., Daniele A. Adiponectin: an attractive marker for metabolic disorders in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Nutrients*, 2013, vol. 5, no. 10, pp. 4115–4125. doi: 10.3390/nu5104115
4. Blot M., David M., Nguyen M., Bourredjem A., Binquet C., Piroth L. Are adipokines the missing link between obesity, immune response, and outcomes in severe COVID-19? *Int. J. Obes. (Lond.)*, 2021, vol. 45, no. 9, pp. 2126–2131. doi: 10.1038/s41366-021-00868-5
5. Chen J.S., Alfajaro M.M., Chow R.D., Wei J., Filler R.B., Eisenbarth S.C., Wilen C.B. Non-steroidal anti-inflammatory drugs dampen the cytokine and antibody response to SARS-CoV-2 infection. *J. Virol.*, 2021, vol. 95, no. 7: e00014-21. doi: 10.1128/JVI.00014-21
6. Chiang C.H., Lai J.S., Hung S.H., Lee L.T., Sheu J.C., Huang K.C. Serum adiponectin levels are associated with hepatitis B viral load in overweight to obese hepatitis B virus carriers. *Obesity*, 2013, vol. 21, no. 2, pp. 291–296. doi: 10.1002/oby.20000
7. Choi H.M., Doss H.M., Kim K.S. Multifaceted physiological roles of adiponectin in inflammation and diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 4. doi: 10.3390/ijms21041219
8. Daniele A., De Rosa A., Nigro E., Scudiero O., Capasso M., Masullo M., De Laurentiis G., Oriani G., Sofia M., Bianco A. Adiponectin oligomerization state and adiponectin receptors airway expression in chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2012, vol. 44, no. 3, pp. 563–569. doi: 10.1016/j.biocel.2011.12.016
9. Dieplinger B., Gegenhuber A., Kaar G., Poelz W., Haltmayer M., Mueller T. Prognostic value of established and novel biomarkers in patients with shortness of breath attending an emergency department. *Clin. Biochem.*, 2010, vol. 43, no. 9, pp. 714–719. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.02.002
10. Ehling A., Schäffler A., Herfarth H., Tärner I.H., Anders S., Distler O., Paul G., Distler J., Gay S., Schölmerich J. The potential of adiponectin in driving arthritis. *J. Immunol.*, 2006, vol. 176, no. 7, pp. 4468–4478. doi: 10.4049/jimmunol.176.7.4468
11. Furuta M., Tamai M., Hanabusa T., Yamamoto Y., Nanjo K., Sanke T. Serum adiponectin is associated with fasting serum C-peptide in non-obese diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2006, vol. 72, no. 3, pp. 302–307. doi: 10.1016/j.diabetes.2005.10.026
12. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang W.H., Ou C.Q., He J.X., Liu L., Shan H., Lei C.L., Hui D.S.C., Du B., Li L.J., Zeng G., Yuen K.Y., Chen R.C., Tang C.L., Wang T., Chen P.Y., Xiang J., Li S.Y., Wang J.L., Liang Z.J., Peng Y.X., Wei L., Liu Y., Hu Y.H., Peng P., Wang J.M., Liu J.Y., Chen Z., Li G., Zheng Z.J., Qiu S.Q., Luo J., Ye C.J., Zhu S.Y., Zhong N.S.; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 382, no. 18, pp. 1708–1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032
13. Hadjadj S., Aubert R., Fumeron F., Pean F., Tichet J., Roussel R., Marre M. Increased plasma adiponectin concentrations are associated with microangiopathy in type 1 diabetic subjects. *Diabetologia*, 2005, vol. 48, no. 6, pp. 1088–1092. doi: 10.1007/s00125-005-1747-x
14. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X. 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
15. Hug C., Wang J., Ahmad N.S., Bogan J.S., Tsao T.-S., Lodish H.F. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2004, vol. 101, no. 28, pp. 10308–10313. doi: 10.1073/pnas.0403382101
16. 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
17. Krakoff J., Funahashi T., Stehouwer C.D., Schalkwijk C.G., Tanaka S., Matsuzawa Y., Kobes S., Tataranni P.A., Hanson R.L., Knowler W.C. Inflammatory markers, adiponectin, and risk of type 2 diabetes in the Pima Indian. *Diabetes Care*, 2003, vol. 26, no. 6, pp. 1745–1751. doi: 10.2337/diacare.26.6.1745
18. Malhotra A., Hillman D. Obesity and the lung: 3. Obesity, respiration and intensive care. *Thorax*, 2008, vol. 63, no. 10, pp. 925–931. doi: 10.1136/thx.2007.086835
19. Mantzoros C.S., Li T., Manson J.E., Meigs J.B., Hu F.B. Circulating adiponectin levels are associated with better glycemic control, more favorable lipid profile, and reduced inflammation in women with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005, vol. 90, no. 8, pp. 4542–4548. doi: 10.1210/jc.2005-0372
20. Masaki T., Chiba S., Tatsukawa H., Yasuda T., Noguchi H., Seike M., Yoshimatsu H. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF α in KK-Ay obese mice. *Hepatology*, 2004, vol. 40, no. 1, pp. 177–184. doi: 10.1002/hep.20282
21. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10229, pp. 1033–1034. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0

22. Nigro E., Scudiero O., Sarnataro D., Mazzarella G., Sofia M., Bianco A., Daniele A. Adiponectin affects lung epithelial A549 cell viability counteracting TNF α and IL-1 β toxicity through AdipoR1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2013, vol. 45, no. 6, pp. 1145–1153. doi: 10.1016/j.biocel.2013.03.003
23. Ohashi K., Ouchi N., Matsuzawa Y. Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin. *Biochimie*, 2012, vol. 94, no. 10, pp. 2137–2142. doi: 10.1016/j.biochi.2012.06.008
24. Ohashi K., Shibata R., Murohara T., Ouchi N. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2014, vol. 25, no. 7, pp. 348–355. doi: 10.1016/j.tem.2014.03.009
25. Otero M., Lago R., Gomez R., Lago F., Dieguez C., Gomez-Reino J.J., Gualillo O. Changes in fat-derived hormones plasma concentrations: adiponectin, leptin, resistin, and visfatin in rheumatoid arthritis subjects. *Ann. Rheum. Dis.*, 2006, vol. 65, no. 9, pp. 1198–1201. doi: 10.1136/ard.2005.046540
26. Pajvani U.B., Hawkins M., Combs T.P., Rajala M.W., Doebber T., Berger J.P., Wagner J.A., Wu M., Knopps A., Xiang A.H. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, no. 13, pp. 12152–12162. doi: 10.1074/jbc.M311113200
27. Pemmari A., Tuure L., Hämäläinen M., Leppänen T., Vuolteenaho K., Moilanen E. Comprehensive effects of ibuprofen on gene expression in chondrocytes as determined by RNA-Seq. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, vol. 27, p. S378. doi: 10.1016/j.joca.2019.02.375
28. Petrakis D., Margină D., Tsarouhas K., Tekos F., Stan M., Nikitovic D., Kouretas D., Spandidos D.A., Tsatsakis A. Obesity – a risk factor for increased COVID-19 prevalence, severity and lethality. *Mol. Med. Rep.*, 2020, vol. 22, no. 1, pp. 9–19. doi: 10.3892/mmr.2020.11127
29. Polito R., Nigro E., Elce A., Monaco M.L., Iacotucci P., Carnovale V., Comegna M., Gelzo M., Zarrilli F., Corso G. Adiponectin expression is modulated by long-term physical activity in adult patients affected by cystic fibrosis. *Mediators Inflamm.*, 2019, vol. 2019: 2153934. doi: 10.1155/2019/2153934
30. 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
31. Sada K.-E., Yamasaki Y., Maruyama M., Sugiyama H., Yamamura M., Maeshima Y., Makino H. Altered levels of adipocytokines in association with insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.*, 2006, vol. 33, no. 8, pp. 1545–1552.
32. Schäffler A., Ehling A., Neumann E., Herfarth H., Tarner I., Schömlerich J., Müller-Ladner U., Gay S. Adipocytokines in synovial fluid. *JAMA*, 2003, vol. 290, no. 13, pp. 1709–1710. doi: 10.1001/jama.290.13.1709-c
33. Schnabel R., Messow C.M., Lubos E., Espinola-Klein C., Rupprecht H.J., Bickel C., Sinning C., Tzikas S., Keller T., Genth-Zotz S., Lackner K.J., Münzel T.F., Blankenberg S. Association of adiponectin with adverse outcome in coronary artery disease patients: results from the AtheroGene study. *Eur. Heart J.*, 2008, vol. 29, no. 5, pp. 649–657. doi: 10.1093/eurheartj/ehn009
34. Simonnet A., Chetboun M., Poissy J., Raverdy V., Noulette J., Duhamel A., Labreuche J., Mathieu D., Pattou F., Jourdain M. 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
35. Sood A., Dominic E., Qualls C., Steffes M.W., Thyagarajan B., Smith L.J., Lewis C.E., Jacobs D.Jr R. Serum adiponectin is associated with adverse outcomes of asthma in men but not in women. *Front. Pharmacol.*, 2011, vol. 2: 55. doi: 10.3389/fphar.2011.00055
36. Takemura Y., Ouchi N., Shibata R., Arahamian T., Kirber M.T., Summer R.S., Kihara S., Walsh K. Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies. *J. Clin. Invest.*, 2007, vol. 117, no. 2, pp. 375–386. doi: 10.1172/JCI29709
37. Tang C.-H., Chiu Y.-C., Tan T.-W., Yang R.-S., Fu W.-M. Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF- κ B pathway. *J. Immunol.*, 2007, vol. 179, no. 8, pp. 5483–5492. doi: 10.4049/jimmunol.179.8.5483
38. Tiftikci A., Atug O., Yilmaz Y., Eren F., Ozdemir F.T., Yapali S., Ozdogan O., Celikel C.A., Imeryuz N., Tozun N. Serum levels of adipokines in patients with chronic HCV infection: relationship with steatosis and fibrosis. *Arch. Med. Res.*, 2009, vol. 40, no. 4, pp. 294–298. doi: 10.1186/1471-230X-14-27
39. Tsuboi I., Tanaka H., Nakao M., Shichijo S., Itoh K. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs differentially regulate cytokine production in human lymphocytes: up-regulation of TNF, IFN- γ and IL-2, in contrast to down-regulation of IL-6 production. *Cytokine*, 1995, vol. 7, no. 4, pp. 372–379. doi: 10.1006/CYTO.1995.0047
40. Vaduganathan M., Vardeny O., Michel T., McMurray J.J., Pfeffer M.A., Solomon S.D. Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors in patients with Covid-19. *New Engl. J. Med.*, 2020, vol. 382, no. 17, pp. 1653–1659. doi: 10.1056/NEJMSr2005760
41. Walkey A.J., Rice T.W., Konter J., Ouchi N., Shibata R., Walsh K., de Boisblanc B.P., Summer R. Plasma adiponectin and mortality in critically ill subjects with acute respiratory failure. *Crit. Care Med.*, 2010, vol. 38, no. 12, pp. 2329–2334. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181fa0561
42. Wang Y., Lam K.S., Yau M.-H., Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem. J.*, 2008, vol. 409, no. 3, pp. 623–633. doi: 10.1042/BJ20071492
43. Wolf A.M., Wolf D., Rumpold H., Enrich B., Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 323, no. 2, pp. 630–635. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.145
44. Wozniak S.E., Gee L.L., Wachtel M.S., Frezza E.E. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig. Dis. Sci.*, 2009, vol. 54, no. 9, pp. 1847–1856. doi: 10.1007/s10620-008-0585-3
45. Wulster-Radcliffe M.C., Ajuwon K.M., Wang J., Christian J.A., Spurlock M.E. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 316, no. 3, pp. 924–929. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.130
46. Yamamoto K., Kiyohara T., Murayama Y., Kihara S., Okamoto Y., Funahashi T., Ito T., Nezu R., Tsutsui S., Miyagawa J. Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gut*, 2005, vol. 54, no. 6, pp. 789–796. doi: 10.1136/gut.2004.046516

47. Yamauchi T., Nio Y., Maki T., Kobayashi M., Takazawa T., Iwabu M., Okada-Iwabu M., Kawamoto S., Kubota N., Kubota T. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature Med.*, 2007, vol. 13, no. 3, pp. 332–339. doi: 10.1038/nm1557
48. Zhi G., Xin W., Ying W., Guohong X., Shuying L. “Obesity paradox” in acute respiratory distress syndrome: asystematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 9: e0163677. doi: 10.1371/journal.pone.0163677

Авторы:

Норузьян М., доцент кафедры медицинской иммунологии, факультет лабораторных наук, Школа смежных медицинских наук, Хормозганский университет медицинских наук, г. Бандар-Аббас, Иран;

Шарифи-Сарасиabi К., Исследовательский центр инфекционных и тропических болезней, Хормозганский институт здоровья, Хормозганский университет медицинских наук, г. Бандар-Аббас, Иран;

Наджафи-Асл М., кафедра лабораторных наук, Школа смежных медицинских наук, Хормозганский университет медицинских наук, г. Бандар-Аббас, Иран; Исследовательский центр инфекционных и тропических болезней, Хормозганский институт здоровья, Хормозганский университет медицинских наук, г. Бандар-Аббас, Иран;

Хассани Азад М., Исследовательский центр инфекционных и тропических болезней, Хормозганский институт здоровья, Хормозганский университет медицинских наук, г. Бандар-Аббас, Иран;

Эстабрагния Бабаки Х., отделение внутренней медицины, больница Шахид Мохаммади, медицинский факультет, Хормозганский университет медицинских наук, г. Бандар-Аббас, Иран.

Authors:

Norouzian M., Assistant Professor of Medical Immunology, Department of Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran;

Sharifi-Sarasiabi K., Infectious and Tropical Diseases Research Center, Hormozgan Health Institute, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran;

Najafi-Asl M., Department of Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran; Infectious and Tropical Diseases Research Center, Hormozgan Health Institute, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran;

Hassani Azad M., Infectious and Tropical Diseases Research Center, Hormozgan Health Institute, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran;

Estabraghnia Babaki H., Department of Internal Medicine, Shahid Mohammadi Hospital, Faculty of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.

Поступила в редакцию 30.07.2021
Отправлена на доработку 20.12.2021
Принята к печати 15.04.2022

Received 30.07.2021
Revision received 20.12.2021
Accepted 15.04.2022

ВКЛАД ЛАКТОФЕРРИНА, СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА КЛАССА А В АНТИМИКРОБНУЮ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ ГРУДНОГО МОЛОКА

В.Г. Арзуманян¹, Т.И. Колыганова^{1,2}, О.А. Свитич^{1,2}, П.В. Самойликов¹,
С.Ю. Конаныхина¹, Т.А. Зайцева², В.В. Зверев^{1,2}

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

² ГАОУВ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Резюме. Проведена оценка вклада антимикробной активности sIgA, лактоферрина, α -лактальбумина, сывороточного альбумина и лизоцима в общую антимикробную активность сыворотки. Исследованы 66 образцов грудного молока, полученных от здоровых матерей в возрасте от 23 до 45 лет на разных сроках лактации. Установлено, что по мере увеличения периода лактации снижалась не только общая антимикробная активность ($r = -0,944$), но и активность низкомолекулярной фракции, содержащей сумму антимикробных пептидов ($r = -0,950$). Медианный уровень лактоферрина менялся от 3,46 мг/мл в молозиве до 0,94 мг/мл через год после начала лактации и коррелировал с активностью сыворотки ($r = 0,616$). Концентрация sIgA в образцах сыворотки была максимальной в сыворотке молозива (5,01 мг/мл) и резко падала при переходе к зрелому молоку, сохраняясь примерно на одном уровне в последующие периоды лактации (1,0 мг/мл). Концентрация сывороточного альбумина значимо снижалась по мере увеличения периода лактации (от 5,52 до 4,68 мг/мл) и коррелировала с активностью сыворотки ($r = 0,589$). Оценка действия очищенного препарата α -лактальбумина в диапазоне 5–20 мг/мл методами спектрофотометрии и микроскопии на клетки *C. albicans* показала отсутствие фунгицидной активности. В то же время очищенные лактоферрин, IgA, лизоцим и сывороточный альбумин демонстрировали прямой фунгицидный эффект. Активность препарата IgA в концентрации, соответствующей содержанию sIgA в сыворотке молозива на первые сутки после родоразрешения составила 50,0%, а через 12 месяцев — 31,0%; лактоферрина — 26,7 и 3,4%; сывороточного альбумина — 15,0 и 17,7%; лизоцима — 0,1 и 1,8%. Таким образом, сумма активностей этих полипептидов в концентрациях, характерных для молозива, составляет 91,7%, что сравнимо с общей активностью его сыворотки — 82,4%. Сумма активностей указанных полипептидов, типичных для 12 месяцев лактации, равна 53,9%, а общая активность сыворотки в этот период составила 64,5%. Итак, наиболее значимыми по антимикробной активности в сыворотке молозива являются IgA и лактоферрин, тогда как спустя 12 месяцев после начала лактации на первый план выходят IgA и сывороточный альбумин.

Ключевые слова: грудное молоко, лактоферрин, иммуноглобулин, сывороточный альбумин, антимикробная активность, *Candida albicans*.

Адрес для переписки:

Колыганова Татьяна Игоревна
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (495) 917-49-00.
E-mail: mech.inst@mail.ru

Contacts:

Tatiana I. Kolyganova
105064, Russian Federation, Moscow, Maly Kazenny lane, 5a.
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
Phone: +7 (495) 917-49-00.
E-mail: mech.inst@mail.ru

Для цитирования:

Арзуманян В.Г., Колыганова Т.И., Свитич О.А., Самойликов П.В.,
Конаныхина С.Ю., Зайцева Т.А., Зверев В.В. Вклад лактоферрина,
сывороточного альбумина и секреторного иммуноглобулина класса А
в антимикробную активность сыворотки грудного молока // Инфекция
и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 519–526. doi: 10.15789/2220-7619-GPO-1759

Citation:

Arzumanyan V.G., Kolyganova T.I., Svitich O.A., Samoilikov P.V.,
Konanykhina S.Yu., Zaytseva T.A., Zverev V.V. An impact of lactoferrin,
serum albumin and secretory immunoglobulin A in antimicrobial activity of breast milk whey // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3,
pp. 519–526. doi: 10.15789/2220-7619-GPO-1759

AN IMPACT OF LACTOFERRIN, SERUM ALBUMIN AND SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A IN ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BREAST MILK WHEY

Arzumanyan V.G.^a, Kolyganova T.I.^{a,b}, Svitich O.A.^{a,b}, Samoilkov P.V.^a, Konanykhina S.Yu.^a, Zaytseva T.A.^b, Zverev V.V.^{a,b}

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

^b *First Moscow State Medical University I.M. Sechenov (Sechenov University), Moscow, Russian Federation*

Abstract. The contribution of the antimicrobial activity of sIgA, lactoferrin, α -lactalbumin, serum albumin, and lysozyme to the total antimicrobial activity of whey was evaluated. 66 breast milk samples from healthy women aged from 23 to 45 years collected at different periods of lactation were studied. It was found that along with proceeding the lactation period, not only the total antimicrobial activity ($r = -0.944$) decreased, but also the activity of the low molecular weight fraction containing the sum of antimicrobial peptides ($r = -0.950$). The median lactoferrin level varied from 3.46 mg/ml in colostrum down to 0.94 mg/ml one year after the onset of lactation that correlated with whey activity ($r = 0.616$). The concentration of sIgA was peaked in the whey of colostrum (5.01 mg/ml) and significantly reduced in mature milk, remaining approximately at the same level in subsequent periods of lactation (1.0 mg/ml). Serum albumin concentration significantly decreased while proceeding through lactation period (from 5.52 to 4.68 mg/ml) and correlated with whey activity ($r = 0.589$). Evaluating effects of the purified α -lactalbumin on *C. albicans* cells within the range of 5–20 mg/ml by spectrophotometry and microscopy showed the absence of fungicidal activity. At the same time, purified lactoferrin, IgA, lysozyme, and serum albumin demonstrated a direct fungicidal effect. The activity of the IgA preparation at a concentration relevant to the sIgA content in the whey of the first day colostrum was 50.0%, and in the whey after 12 months — 31.0%; lactoferrin — 26.7% and 3.4%; serum albumin — 15.0% and 17.7%; lysozyme — 0.1% and 1.8%. Thus, the sum of the activities of these polypeptides at concentrations typical for the first-day colostrum was 91.7%, which is comparable to the total activity of this whey — 82.4%. The sum of the activities of these polypeptides, typical for 12 months of lactation, was 53.9%, and the total whey activity relevant to this period was 64.5%. Therefore, IgA and lactoferrin contribute the most significant antimicrobial activity in the whey of colostrum, whereas after 12 month-breastfeeding IgA and serum albumin become most significant.

Key words: breast milk, lactoferrin, immunoglobulin A, serum albumin, antimicrobial activity, *Candida albicans*

Введение

Грудное молоко служит не только полноценным источником питания, но и обеспечивает противомикробную защиту протоков молочных желез матери и пищеварительного тракта ребенка от патогенной микробиоты. В качестве антимикробных агентов грудного молока могут выступать как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные полипептиды. Среди высокомолекулярных факторов гуморальной защиты обычно упоминают казеин, муцин и иммуноглобулины классов А, G и M, причем в наиболее высокой концентрации в грудном молоке представлен секреторный иммуноглобулин — sIgA — от 2 до 5,5 мг/мл [9]. К низкомолекулярным факторам относятся антимикробные (поли)пептиды (АМП) — лактоферрин, лизоцим, дефензины, кателицидин, лактопероксидаза, дермцидин, гепцидин, лактальбумин и др. [5]. Среди АМП в наибольших концентрациях в грудном молоке встречаются лактоферрин (до 7 мг/мл) [19], лактальбумин (до 4 мг/мл) [11] и лизоцим (до 0,9 мг/мл) [16]. Кроме того, в грудном молоке присутствует сывороточный альбумин, который по нашим данным также обладает антимикробной активностью [2]. Показано также, что наибольшая концентрация АМП имеет место в молозиве [5]. Недавно с помощью метода спектрофотометрии установлено, что антимикробная активность сыворотки грудного молока находится в обратной корреляции с периодом лактации,

то есть наибольшую защиту ребенка от патогенов обеспечивает молозиво [4]. Однако отсутствуют данные о вкладе наиболее значимых антимикробных компонентов и низкомолекулярной фракции сыворотки в общую противомикробную активность грудного молока на протяжении всего периода лактации, что и явилось целью настоящего исследования.

Материалы и методы

В исследование включены 66 образцов грудного молока, полученных от здоровых матерей в возрасте от 23 до 45 лет на разных сроках лактации. Свежесобранные образцы замораживали до момента получения сывороток при -25°C .

Сыворотки получали в два этапа: 1) обезжиривание путем центрифугирования со скоростью 16 000 об/мин в течение 5 мин; 2) удаление казеина путем подкисления 20% раствором лимонной кислоты из расчета 0,06 мл кислоты на 4 мл с повторным центрифугированием [3].

Антимикробную активность определяли методом спектрофотометрии [7]. Для этого 300 мкл сыворотки соединяли с 50 мкл суспензии клеток *Candida albicans* № 927 (коллекция НИИВС им. Мечникова), выращенной на плотной глюкозо-пептон-дрожжевой среде; контрольная проба вместо сыворотки содержала 300 мкл физраствора. Суспензию клеток готовили из расчета 1 микробиологическая петля в 50 мкл физраствора. Пробы инкубировали 2 ч при 32°C на шейкере,

центрифугировали 5 мин со скоростью 16 000 об/мин, надосадочную жидкость удаляли, а в осадки вносили по 300 мкл раствора бромкрезолового пурпурного в фосфатном буфере pH 4,6. Пробы повторно инкубировали 45 мин при 32°C и вновь центрифугировали. Осадки микроскопировали при суммарном увеличении 1750 (ЛОМО, Россия) и фотографировали цифровой камерой «Sony» (Япония). Из полученных супернатантов отбирали по 50 мкл и соединяли с 2,5 мл фосфатного буфера (pH 4,6). Оптическую плотность полученных растворов оценивали на спектрофотометре «Genesys 10SUV-Vis» (США), длина волны 440 нм. Для каждой пробы рассчитывали среднее значение из трех измерений. Активность рассчитывали, как отношение разности между оптической плотностью контрольного и опытного образцов, отнесенной к оптической плотности контрольного образца и выраженной в процентах [1].

Низкомолекулярную фракцию, содержащую комплекс АМП, получали из сывороток путем их фильтрации через молекулярные фильтры с размером пор 100 kDa (Amicon Ultra-0,5, Millipore, Merck). Для этого в предварительно замоченные дистиллированной водой в течение 1 ч фильтры вносили по 500 мкл сыворотки и центрифугировали со скоростью 16 000 об/мин в течение 15 мин. Антимикробную активность полученных фильтратов определяли аналогично образцам сыворотки (см. выше).

Активность чистых препаратов лактоферрина, лактальбумина и лактопероксидазы, полученных из грудного молока методом ионообменной хроматографии (Лактбио, Москва), человеческого сывороточного альбумина (квалификация High Purity, EMD Millipore Corp., США), человеческого IgA (Имтек, Россия), а также яичного лизоцима (квалификация BioChemica, AppliChem, США), оценивали тем же способом (см. выше).

Уровень лактоферрина в образцах сыворотки определяли методом иммуноферментного анализа с помощью тест-системы «ELISA Kit for Lactoferrin (LTF human)» (Cloud-Clone Corp., США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Тест-система предназначена для определения лактоферрина в различных биожидкостях, включая сыворотку грудного молока. Разведение сывороток составило 1:1 000 000.

Уровень sIgA в образцах сыворотки оценивали методом иммуноферментного анализа с помощью тест-системы «IgA секреторный-ИФА-БЕСТ» (Вектор-Бест, Новосибирск), предназначенной для определения данного иммуноглобулина в образцах сыворотки крови. Разведение сывороток грудного молока составило 1:10 000.

Концентрацию сывороточного альбумина измеряли с помощью набора реагентов «Альбумин

Абрис+» (НПФ «Абрис+», Санкт-Петербург). Метод основан на образовании окрашенных комплексных соединений при взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым в слабокислой среде в присутствии детергента. К 10 мкл сыворотки добавляли 2 мл реактива, выдерживали 10 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность при длине волны 628 нм. Предварительно с помощью того же набора реагентов оценивали взаимодействие чистого лактальбумина, полученного путем ионообменной хроматографии из грудного молока (Лактбио, Москва), с тем же реактивом. Анализ показал отсутствие реакции между лактальбумином и указанными выше реагентами.

Расчет продукции и потребления лактоферрина, лизоцима, сывороточного альбумина и sIgA на первые сутки и через 12 месяцев от начала лактации проводили на основании собственных данных и данных литературы.

Статистический анализ выполняли с помощью программы Microsoft Excel. Расчет коэффициентов Манна–Уитни, свидетельствующих о наличии/отсутствии значимости различий между показателями, проводили с помощью автоматической программы [6].

Результаты

Образцы сывороток грудного молока разделили на 5 равноценных групп в соответствии с периодом лактации: первая группа состояла из сывороток молозива, остальные — из сывороток переходного и зрелого молока (табл. 1). Видно, что по мере увеличения периода лактации значительно снижалась не только общая антимикробная активность, но и активность фракции, содержащей АМП, о чем свидетельствуют соответствующие значения коэффициентов Манна–Уитни. При этом обращают на себя внимание высокие значения коэффициентов Пирсона, свидетельствующие о наличии положительной корреляции между этими показателями, а также об их обратной корреляции по отношению к периоду лактации. Однако с возрастом матери ни общая антимикробная активность, ни активность АМП фракции сыворотки не были связаны.

На одном из наиболее активных образцов сыворотки молока проведено исследование его действия на клетки *C. albicans* методом микроскопии: в контрольном варианте присутствуют как живые (белые) клетки, так и некоторое количество мертвых (желтых клеток) (рис. 1А, III обложка); в пробе, обработанной цельной сывороткой — обилие клеточного дебриса (полностью разрушенных клеток) и немного живых (рис. 1Б, III обложка); в пробе, обработанной низкомолекулярной фракцией сыворотки, мертвые клетки явно преобладают над живыми (рис. 1В, III обложка).

Таблица 1. Взаимосвязь биологических и иммунологических показателей сыворотки грудного молока
Table 1. Interrelation of biological and immunological parameters of breast milk serum

Человек в группе, N Subjects in group, N	Период лактации Lactation period	Период лактации, месяцы (медиана) Lactation period, months (median)	Возраст матери, лет (медиана) Mother's age, years (median)	Активность сыворотки общая, % (медиана) Total serum activity, % (median)	Активность фракции ниже 100 kDa, % (медиана) Activity of the fraction lower 100 kDa, % (median)	Лактоферрин, мг/мл (медиана) Lactoferrin, mg/ml (median)	Альбумин сывороточный, мг/мл (медиана) Serum albumin, mg/ml (median)	lgA, мг/мл (медиана) lgA, mg/ml (median)
12	1 день — 1 неделя 1 day — 1 week	0,067	31	82,4	37,9	3,46	5,53	5,01
12	2 недели — 2,5 месяца 2 weeks — 2.5 months	1	28	84,8	34,6	1,39	4,80	0,92
14	3–7,5 месяцев 3–7.5 months	5	31,5	73,2	31,2	1,49	4,77	1,00
14	8–11 месяцев 8–11 months	9	30,5	63,6	28,4	1,19	4,73	1,30
14	12–27 месяцев 12–27 months	15	30,5	61,8	26,4	0,94	4,68	0,94
r ₁		-0,944	-0,431	-0,944	-0,950	-0,668	-0,643	-0,527
r ₂				-	0,937	0,616	0,589	0,452
r ₃				-0,431	-0,189	0,265	0,226	0,315
Значимость различий между 1 и 5 группами Significance of differences between groups 1 and 5	-	p ≤ 0,01	p > 0,05	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01

Примечание. r₁ — коэффициент корреляции Пирсона, характеризующий наличие взаимосвязи данного показателя с периодом лактации; r₂ — коэффициент корреляции Пирсона, характеризующий наличие взаимосвязи данного показателя с возрастом матери.
Note. r₁ — Pearson's correlation coefficient, characterizing interrelation between this parameter with the lactation period; r₂ — Pearson correlation coefficient, characterizing interrelation between this parameter with the total activity of serum; r₃ — Pearson's correlation coefficient, characterizing interrelation between this parameter with the age of the mother.

Оценка содержания лактоферрина в изучаемых образцах сыворотки показала, что наиболее высокие его концентрации имели место в молозиве, причем отмечено его многократное снижение при переходе к зрелому молоку. Уровень лактоферрина имел высокую положительную корреляцию не только с общей противомикробной активностью (табл. 1), но и с активностью АМП фракции сыворотки — коэффициент Пирсона составил 0,845. Экспериментальные и расчетные данные, касающиеся продукции и потребления лактоферрина на первые сутки и через 12 месяцев от начала лактации приведены в табл. 2.

Оценка действия нативного альфа-лактальбумина в концентрации 5–20 мг/мл методами спектрофотометрии на клетки изучаемого штамма *C. albicans* показала отсутствие какой-либо фунгицидной активности. Полученный результат подтвержден также методом микроскопии — клетки дрожжей оставались интактными после 2 ч инкубации с этим препаратом.

Концентрация сывороточного альбумина значительно снижалась по мере увеличения периода лактации и коррелировала с активностью сыворотки (табл. 1). Имела место также высокая положительная корреляция с лактоферрином ($r = 0,994$). Расчет максимальной продукции и потребления сывороточного альбумина приведен в табл. 2.

Исследование концентрации sIgA в образцах сыворотки показало, что она была максимальной в сыворотке молозива и резко падала при переходе к зрелому молоку, сохраняясь примерно на одном уровне в последующие периоды лактации (табл. 1). Расчет наибольшей продукции и потребления sIgA приведен в табл. 2.

Концентрацию лизоцима в сыворотке грудного молока в данном исследовании не определяли. Для расчетов воспользовались данными [16], где показано, что на всем протяжении периода лактации лизоцим меняется от 0,32 мг/мл в молозиве до 0,85 мг/мл спустя год после начала лактации [16]. Наибольшие расчетные значения продукции и потребления лизоцима приведены в табл. 2.

Фунгицидная активность лактопероксидазы при концентрации 2,5 мг/мл составила 12–14%.

Для того чтобы оценить вклад лактоферрина, сывороточного альбумина, лизоцима и IgA в антимикробную активность сыворотки грудного молока в первые сутки и через 12 месяцев после начала лактации, провели определение противомикробной активности чистых препаратов этих полипептидов в концентрациях, соответствующих их содержанию в молозиве и грудном молоке в указанные периоды (табл. 2). Полученные данные представлены на рис. 2. Сумма активностей этих полипептидов в концентрациях, характерных для односуточного молозива, составляет 91,7%, что сравнимо с об-

Таблица 2. Экспериментальные и расчетные данные по продукции и потреблению лактоферрина, лизоцима, сывороточного альбумина и sIgA на первые сутки и через 12 месяцев от начала лактации

	Средний объем в сутки, мл* Average volume per day, ml*	Средний вес ребенка, кг* Average weight of a child, kg*	Лактоферрин Lactoferrin		Лизоцим Lysozyme		Сывороточный альбумин Serum albumin		Секреторный IgA Secretory IgA	
			Макс. концентрация, мг/мл Max. concentration, mg/ml	Макс. потребление, мг/кг × сут. Max. consumption, mg/kg × day	Макс. концентрация, мг/мл* Max. concentration, mg/ml*	Макс. потребление, мг/кг × сут. Max. consumption, mg/kg × day	Макс. концентрация, мг/мл Max. concentration, mg/ml	Макс. потребление, мг/кг × сут. Max. consumption, mg/kg × day	Макс. концентрация, мг/мл Max. concentration, mg/ml	Макс. потребление, мг/кг × сут. Max. consumption, mg/kg × day
Молозиво (1-е сутки) Colostrum (1 st day)	10	3	10,8	36	0,32	1,1	8,8	29	6,8	22,7
Зрелое молоко (12 месяцев) Mature milk (12 months)	650	10	1,0	65	0,85	55,3	4,7	305	2,0	130,0
Кратность увеличения за 12 месяцев Multiplicity of increase in 12 months			–	1,8	–	50,3	–	10,5	–	5,7

Примечание. * — приведены данные из литературных источников.
Note. * — data from literary sources.

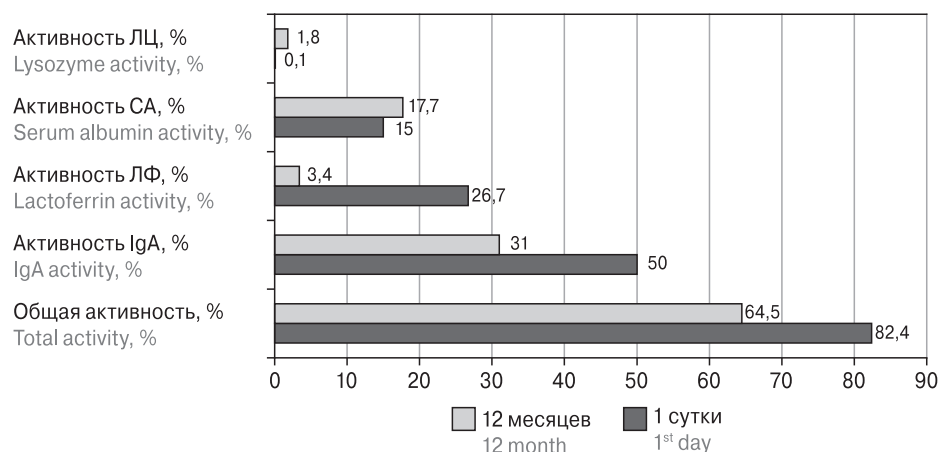


Рисунок 2. Вклад лактоферрина, сывороточного альбумина, лизоцима и IgA в антимикробную активность сыворотки грудного молока в первые сутки и через 12 месяцев после начала лактации

Figure 2. An impact of lactoferrin, serum albumin, lysozyme and IgA to the antimicrobial activity of breast milk serum on the first day and 12 months after the onset of lactation

шей активностью сыворотки для этого периода. Сумма активностей в концентрациях, типичных для 12 месяцев лактации, равна 53,9%, что также сравнимо с общей активностью в указанный период. Микроскопия образцов клеток дрожжей, обработанных этими полипептидами, показала наличие фунгицидного эффекта: клетки разрушались с образованием дебриса.

Обсуждение

Фунгистатическое действие грудного молока было ранее установлено методом посевов [8]. Методы спектрофотометрии и микроскопии позволяют оценить фунгицидный эффект любой биожидкости по отношению к клеткам микроорганизмов [7]. Ранее этими методами показано фунгицидное действие сыворотки грудного молока на клетки дрожжей *C. albicans* [4]. В настоящем исследовании получены данные, подтверждающие антимикробную активность цельной сыворотки. Кроме того, изучена антимикробная активность низкомолекулярной фракции сыворотки, содержащей АМП. Оказалось, что как общая активность сыворотки, так и активность ее низкомолекулярной фракции обратно пропорциональны длительности периода лактации, но не связаны с возрастом матери.

Одним из основных белков сыворотки грудного молока является лактоферрин, который составляет до 20% от общего белка сыворотки [14]. Он устойчив к протеолизу и выполняет ряд функций: участвует в процессах эндоцитоза; внутри клеток действует как регулятор экспрессии многих генов, в том числе отвечающих за синтез цитокинов; способствует поглощению железа клетками; является эффективным модулятором воспалительного и иммунного ответа. На клетки микроорганизмов он действует двояко — с одной

стороны, обедняет среду, связывая ионы железа, с другой — нарушает целостность мембран. Известно, что лактоферрин оказывает фунгистатическое действие на клетки *C. albicans*, подтвержденное методом посевов [21]. Полученные нами результаты по снижению его концентрации при переходе от молозива к зрелому молоку согласуются с данными других авторов [14]. Необходимо отметить, что снижение содержания лактоферрина (табл. 1) и его доли в общей антимикробной активности сыворотки (рис. 2) в процессе лактации не критично, поскольку за счет увеличения объема продуцируемого молока общее потребление этого полипептида за 12 месяцев кормления возрастает почти вдвое (табл. 2).

Альфа-лактальбумин составляет 25–35% от сывороточного белка, а его концентрация равна в среднем 4,3 мг/мл в молозиве и 2,6 мг/мл через год после начала лактации [14]. Известно, что альфа-лактальбумин ингибирует рост микроорганизмов, по-видимому, за счет связывания ионов кальция, цинка и железа, а пептиды, образующиеся при его протеолизе, обладают фунгицидным эффектом [15]. В настоящем исследовании установлено, что этот полипептид не проявляет непосредственной фунгицидной активности.

Лактопероксидаза не вносит существенного вклада в общую антимикробную активность грудного молока, поскольку содержание этого полипептида варьирует в пределах $0,77 \pm 0,38$ мг/л [21], а в данном исследовании установлено, что фунгицидную активность этот полипептид проявлял в концентрации выше 1 мг/мл.

Считают, что сывороточный альбумин синтезируется не молочной железой, а проникает в грудное молоко из сосудов [14]. Содержание сывороточного альбумина, оцененное нами

с помощью вышеуказанного реагента, превысило данные, полученные другими исследователями — менее 1 мг/мл [17], что, вероятно, связано с использованием ими метода препаративного электрофореза. Ранее нами установлено, что сывороточный альбумин в широком диапазоне концентраций проявлял антимикробную активность [2]. Изменение содержания этого полипептида в процессе лактации не настолько значимо, как в случае с лактоферрином (табл. 1), но его вклад в общую активность (рис. 2) и суточное потребление (табл. 2) значительно повышаются через год после начала лактации.

Лизоцим в связи с низкой его концентрацией в молозиве и зрелом молоке не вносит существенного вклада в общую активность сыворотки (рис. 2), однако его потребление значительно возрастает с увеличением периода лактации (табл. 2).

Полученные нами данные по изменению концентрации секреторного иммуноглобулина класса А на протяжении периода лактации согласуются с результатами других авторов [14]. В научной литературе есть данные о фунгистатической активности IgA по отношению к дрожжам *C. albicans*, оцененной методом посевов [10]. На моноклональных антителах класса А показано наличие фунгицидной активности против тех же дрожжей, установленной тем же методом [13]. Однако в современных учебных пособиях и на-

учных публикациях указано, что антитела непосредственным микробицидным действием не обладают. В настоящем исследовании опыты по фунгицидной активности чистого препарата иммуноглобулина проводили не на sIgA, а на IgA. На основании полученных данных можно подтвердить, что иммуноглобулин класса А оказывает прямое микробицидное действие на клетки *C. albicans*, которое проявляется в разрушении клеточных стенок и мембран этих дрожжей, наблюдаемом через 2 ч от начала эксперимента.

Очевидно, что наиболее значимыми по антимикробной активности в сыворотке молозива являются IgA и лактоферрин, тогда как спустя 12 месяцев после начала лактации на первый план выходят IgA и сывороточный альбумин. Известно, что совместное действие АМП может носить синергичный характер [18], что не исключает и взаимного подавления активности и подтверждается сравнением суммы активностей отдельных полипептидов с общей активностью сыворотки (рис. 2). Однако данное предположение требует дальнейших исследований.

Благодарности

Авторы благодарят сотрудников лаборатории физиологии грибов и бактерий Артемьеву Тамару Алексеевну и Бутовченко Любовь Михайловну за техническую и моральную поддержку.

Список литературы/References

1. Арзумян В.Г., Ожован И.М. Модифицированный метод оценки целостности цитоплазматической мембраны клеток эукариот // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002. Т. 134, № 7. С. 118–120. [Arzumanyan V.G., Ozhovan I.M. Modified method for evaluation of plasma membrane integrity in eukaryotic cell. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2002, vol. 134, no. 7, pp. 118–120. (In Russ.)] doi: 10.1023/A:1020641629319
2. Арзумян В.Г., Ожован И.М., Свитич О.А. Антимикробное действие альбумина на клетки бактерий и дрожжей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 167, № 6. С. 722–725. [Arzumanyan V.G., Ozhovan I.M., Svitich O.A. Antimicrobial effect of albumin on bacteria and yeast cells. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2019, vol. 167, no. 6, pp. 763–766. (In Russ.)] doi: 10.1007/s10517-019-04618-6
3. Богатова О.В., Догаева Н.Г. Определение качества молока: методические указания к лабораторному практикуму. Оренбург: Оренбургский государственный университет, 2002. 39 с. [Bogatova O.V., Dogaeva N.G. Determination of milk quality: methodological instructions for laboratory practice. *Orenburg: Orenburg State University*, 2002. 39 p. (In Russ.)]
4. Колыганова Т.И., Арзумян В.Г., Богданова Е.А., Зверев В.В. Альтернативные методы оценки противомикробной активности сыворотки грудного молока // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Т. 171, № 4. С. 525–528. [Kolyganova T.I., Arzumanyan V.G., Bogdanova E.A., Zverev V.V. Alternative methods in estimation of antimicrobial activity of breast milk serum. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2021, vol. 171, no. 4, pp. 525–528. (In Russ.)] doi: 10.47056/0365-9615-2021-171-4-525-528
5. Колыганова Т.И., Арзумян В.Г., Хорошко Н.В., Зверев В.В. Различия гуморальных факторов иммунной защиты грудного молока и молозива // Вопросы детской диетологии. 2021. Т. 19, № 2. С. 33–40. [Kolyganova T.I., Arzumanyan V.G., Khoroshko N.V., Zverev V.V. Differences in the humoral factors of the immune defence of breast milk and colostrum. *Voprosy detskoi dietologii = Pediatric Nutrition*, 2021, vol. 19, no. 2, pp. 33–40. (In Russ.)] doi: 10.20953/1727-5784-2021-2-33-40
6. Математические методы обработки данных (онлайн расчет). [Mathematical methods of data processing (online calculation)]. URL: <https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html>
7. Патент № 2602298 Российская Федерация, МПК G01N 33/48 (2006.01). Способ определения совокупной активности антимикробных пептидов как маркера состояния местного иммунитета различных эпителиальных тканей: № 2015113069/15; заявлено 2015.10.04; опубликовано 2016.11.20 / Арзумян В.Г., Мальбахова Е.Т., Фошина Е.П., Артемьева Т.А., Бутовченко Л.М., Вартанова Н.О., Шмелева О.А. Патентообладатель: ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. 10 с. [Patent No. 2602298 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/48 (2006.01). Method for determining antimicrobial peptide total activity as a marker of tissue immunity state of various epithelial tissues. No. 2015113069/15; application: 2015.10.04:

- date of publication 2016.11.20 / Arzumanjan V.G., Malbakhova E.T., Foshina E.P., Artemeva T.A., Butovchenko L.M., Vartanova N.O., Shmeleva O.A. Proprietors: Gosudarstvennoe uchrezhdenie Nauchnoissledovatel'skij institut vaksiny i syvoro-tok im. I.I. Mechnikova (GU NIIVS im. I.I. Mechnikova). 10 p.]
8. Andersson Y., Lindquist S., Lagerqvist C., Hernell O. Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk. *Early Hum. Dev.*, 2000, vol. 59, no. 2, pp. 95–105. doi: 10.1016/s0378-3782(00)00086-4
 9. Brandtzaeg P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J. Pediatr.*, 2010, vol. 156, no. 2 (Suppl.), pp. S8–S15. doi: 10.1016/j.jpeds.2009.11.014
 10. Funakoshi S., Doi T., Nakajima T., Suyama T., Tokuda M. Antimicrobial effect of human serum IgA. *Microbiol. Immunol.*, 1982, vol. 26, no. 3, pp. 227–239. doi: 10.1111/j.1348-0421.1982.tb00174.x
 11. Garcia-Rodenas C.L., De Castro C.A., Jenni R., Thakkar S.K., Beauport L., Tolsa J.F., Fischer-Fumeaux C.J., Affolter M. Temporal changes of major protein concentrations in preterm and term human milk. A prospective cohort study. *Clin. Nutr.*, 2019, vol. 38, no. 4, pp. 1844–1852. doi: 10.1016/j.clnu.2018.07.016.
 12. Garib D.J., Ahmed A.A., Ismaeil A.S. Inhibitory effect of breast milk against pediatric bacterial infection. *J. Pure Appl. Sci.*, 2011, vol. 23, 7p.
 13. Kavishwar A., Shukla P.K. Candidacidal activity of a monoclonal antibody that binds with glycosyl moieties of proteins of *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 2006, vol. 44, no. 2, pp. 159–167. doi: 10.1080/13693780500266038
 14. Lönnerdal B., Erdmann P., Thakkar S.K., Sauser J., Destailats F. Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective. *J. Nutr. Biochem.*, 2017, vol. 41: 1–11. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.06.001
 15. Lönnerdal B., Lien E.L. Nutritional and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants. *Nutr. Rev.*, 2003, vol. 61, no. 9, pp. 295–305. doi: 10.1301/nr.2003.sept.295-305.
 16. Montagne P., Cuillière M.L., Molé C., Béné M.C., Faure G. Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2001, vol. 501, pp. 241–247. doi: 10.1007/978-1-4615-1371-1_30
 17. Nagasawa T., Kiyosawa I., Fukuwatari Y., Kitayama T., Uechi M. Alpha-lactalbumin and serum albumin in human milk. *J. Dairy Sci.*, 1973, vol. 56, no. 2, pp. 177–180. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(73)85142-2
 18. Nakano M., Suzuki M., Wakabayashi H., Hayama K., Yamauchi K., Abe F., Abe S. Synergistic anti-candida activities of lactoferrin and the lactoperoxidase system. *Drug Discov. Ther.*, 2019, vol. 13, no. 1, pp. 28–33. doi: 10.5582/dtd.2019.01010
 19. Rai D., Adelman A.S., Zhuang W., Rai G.P., Boettcher J., Lönnerdal B. Longitudinal changes in lactoferrin concentrations in human milk: a global systematic review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2014, vol. 54, no. 12, pp. 1539–1547. doi: 10.1080/10408398.2011.642422
 20. Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P., Wu P.C., So M. The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans*. *APMIS*, 1997, vol. 105, no. 11, pp. 875–883.
 21. Shin K., Hayasawa H., Lönnerdal B. Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immuno-adsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, vol. 73, no. 5, pp. 984–989. doi: 10.1093/ajcn/73.5.984

Авторы:

Арзуманян В.Г., д.б.н., профессор, зав. лаб. физиологии грибов и бактерий ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Колыганова Т.И., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет); младший научный сотрудник лаборатории физиологии грибов и бактерий ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Свитич О.А., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, директор ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Самойликов П.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории аллергодиагностики ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Конаныхина С.Ю., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологических методов исследования ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Зайцева Т.А., к.м.н., старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;
Зверев В.В., академик РАН, д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет); научный руководитель Института ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Arzumanian V.G., PhD, MD (Biology), Professor, Head of Laboratory Physiology of Fungi and Bacteria, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Kolyganova T.I., Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Junior Researcher, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Svitich O.A., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Professor of the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;
Samoylikov P.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Allergy Diagnostics, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Konanykhina S.Yu., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Immunodiagnostic Research Methods, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Zaytseva T.A., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;
Zverev V.V., RAS Full Member, PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Scientific Director of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

ЗНАЧЕНИЕ ЭКСКРЕТИРУЕМЫХ С МОЧОЙ АНТИТЕЛ В СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

Т.К. Дзагурова¹, Р.Т. Мурзабаева², Ф.Г. Кутлугужина³, В.Г. Морозов⁴,
Э.В. Вольных⁵, С.С. Курашова¹, М.В. Баловнева¹, П.Е. Ткаченко⁶,
А.А. Ишмухаметов^{1,6}, А.В. Белякова¹, Е.А. Ткаченко¹

¹ ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия

² ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ России, г. Уфа, Россия

³ ГБУЗ Республиканская клиническая больница, г. Уфа, Россия

⁴ ООО Медицинская компания «Гепатолог», г. Самара, Россия

⁵ ГБУЗ СО Новокуйбышевская центральная городская больница, г. Новокуйбышевск, Самарская область, Россия

⁶ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Введение. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — инфекционное заболевание зоонозной природы, распространенное на евроазиатском континенте, в России занимает ведущее место среди природно-очаговых болезней человека. Возбудителями ГЛПС являются хантавирусы, которые согласно современной таксономии, в составе семейства *Hantaviridae* входят в отряд *Bunyavirales*. Подавляющее большинство случаев ГЛПС в России, около 98%, ассоциировано с вирусом Пуумала. Ранняя специфическая диагностика этого заболевания, характеризующегося широким спектром клинических проявлений, является решающим условием своевременной патогенетической терапии. Цель исследования — уточнение диагностической значимости выявления специфических антител к хантавирусам в моче у больных с подозрением на ГЛПС. **Материалы и методы.** На присутствие специфических антител к хантавирусам исследовали сыворотки крови и пробы мочи, собранные с двухдневным интервалом от 68 больных с подозрением на ГЛПС (клиническая инфекционная больница № 4 г. Уфы), а также от 15 реконвалесцентов после ГЛПС через 1, 2, 3 и 6 месяцев с начала заболевания. Кроме того, были исследованы забранные в различные сроки от начала болезни сыворотки крови и пробы мочи от 53 больных с диагнозом ГЛПС? (стационары Москвы, Московской и Самарской областей). Хантавирусные антитела определяли непрямой методом иммунофлюоресценции. **Результаты и обсуждение.** Хантавирусные антитела помимо сывороток крови, выявляли в пробах мочи больных с подозрением на ГЛПС на 3, 4, 5 и 6 дни от начала заболевания в 85,7, 89,4, 93,1 и 100% случаев, соответственно. Наиболее высокое содержание антител в моче отмечали в период с 5 по 11 сутки, что соот-

Адрес для переписки:

Дзагурова Тамара Казбековна
108819, Россия, Москва, пос. Московский, п. Института полиомиелита, двлд. 8, корп. 1, ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита).
Тел.: 8 (495) 841-90-94. Факс: 8 (495) 841-93-21.
E-mail: centrjpls@yandex.ru

Contacts:

Tamara K. Dzagurova
108819, Russian Federation, Moscow, Settlement "Moskovskiy",
Village of Institute of Poliomyelitis, Premises 8, build. 1, Chumakov
Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-
and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute
of Poliomyelitis).
Phone: +7 (495) 841-90-94. Fax: +7 (495) 841-93-21.
E-mail: centrjpls@yandex.ru

Для цитирования:

Дзагурова Т.К., Мурзабаева Р.Т., Кутлугужина Ф.Г., Морозов В.Г.,
Вольных Э.В., Курашова С.С., Баловнева М.В., Ткаченко П.Е.,
Ишмухаметов А.А., Белякова А.В., Ткаченко Е.А. Значение экскретируемых
с мочой антител в специфической диагностике геморрагической
лихорадки с почечным синдромом // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12,
№ 3. С. 527–534. doi: 10.15789/2220-7619-UEA-1822

Citation:

Dzagurova T.K., Murzabaeva R.T., Kutluguzhina F.G., Morozov V.G., Volnyh E.V.,
Kurashova S.S., Balovneva M.V., Tkachenko P.E., Ishmukhametov A.A.,
Belyakova A.V., Tkachenko E.A. Urine excreted antibodies significance
in the hemorrhagic fever with renal syndrome specific diagnosis // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3,
pp. 527–534. doi: 10.15789/2220-7619-UEA-1822

ветствует олигурическому периоду болезни. В реконвалесцентном периоде присутствие антител в моче отмечено спустя 1, 2 и 3 месяца от начала заболевания в 86,7, 46 и 20% случаев, соответственно. Через 6 месяцев от начала заболевания хантавирусных антител в моче не было обнаружено, что, вероятно, отражает процесс длительного восстановления функциональной способности почек. Умеренная положительная корреляционная зависимость количественного содержания антител в сыворотке крови и моче отмечена только в олигурическом периоде болезни. Обнаружение хантавирусных антител у лихорадящих больных с подозрением на ГЛПС одновременно в сыворотке крови и моче является достоверным диагностическим критерием острой хантавирусной инфекции. **Выводы.** Выявление хантавирусных антител одновременно в крови и моче лихорадящих больных позволяет осуществлять специфическую диагностику ГЛПС с первых дней госпитализации, не прибегая к исследованию парных сывороток крови. Ранняя диагностика, в свою очередь, позволяет своевременно назначать патогенетическую терапию и снижать частоту развития тяжелых осложнений и неблагоприятных исходов при данной инфекции.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, хантавирусная инфекция, непрямой метод иммунофлюоресценции, ранняя специфическая диагностика.

URINE EXCRETED ANTIBODIES SIGNIFICANCE IN THE HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME SPECIFIC DIAGNOSIS

Dzagurova T.K.^a, Murzabaeva R.T.^b, Kutluguzhina F.G.^c, Morozov V.G.^d, Volnyh E.V.^e, Kurashova S.S.^a, Balovneva M.V.^a, Tkachenko P.E.^f, Ishmukhametov A.A.^{a,f}, Belyakova A.V.^a, Tkachenko E.A.^a

^a Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences" (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation

^b Bashkir State Medical University, Ministry of Health of Russia, Ufa, Russian Federation

^c Republic Clinical Diseases Hospital, Ufa, Russian Federation

^d Medical Company "Hepatolog", Samara, Russian Federation

^e Novokuibyshevsk Central City Hospital, Novokuibyshevsk, Samara Region, Russian Federation

^f Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Relevance. Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is an acute viral zoonosis. Being widespread in Eurasia, it holds a leading place in Russia among natural focal human diseases. The vast majority of HFRS cases in Russia, about 98%, are associated with Puumala virus. The disease is characterized by a wide range of clinical manifestations. Early specific diagnostics appears to be of a great importance for starting timely pathogenic therapy. The aim of the study was to clarify the diagnostic value of detecting hantavirus antibodies in the HFRS suspected patient urine. **Materials and methods.** Blood sera and urine samples from 68 patients at the Infectious Diseases Hospital in the city of Ufa, obtained with a 2-day interval, as well as urine and blood serum samples from 15 convalescents 1, 2, 3 and 6 months after disease onset were examined for hantavirus antibodies. 53 blood sera and urine samples from patients residing in Moscow, Moscow and Samara regions collected at different time points during the disease course were investigated in parallel. Antibodies were detected by the indirect immunofluorescence method. **Results.** On day 3, 4, 5 and 6 of disease, while specific antibodies were detected in the blood serum, antibodies in the urine were found in 85.7%, 89.4%, 93.1% and 100% of patients, respectively. The peak quantity of antibodies was excreted in the urine from days 5 to 11, which corresponds to the oliguric stage of the disease. In the convalescent period, antibodies were still detected in urine 1, 2 and 3 months afterwards in 86.7%, 46% and 20% of cases, respectively, but not detected 6 months later, which probably reflects the process of long-term restoration of the kidneys function. A moderate positive correlation between specific antibodies in serum and urine was observed only in the oliguric period of the disease. **Conclusions.** Detection of hantavirus antibodies simultaneously in blood serum and urine of febrile patients instead of paired blood sera allows to conduct HFRS diagnostics within the very first days of hospitalization and prevent severe complications due to timely pathogenic therapy.

Key words: hemorrhagic fever with renal syndrome, hantaviruses, indirect fluorescent antibody assay, early specific diagnosis.

Введение

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — зоонозное заболевание вирусной природы, широко распространенное в ряде стран Евразии, в России занимает ведущее место среди всех природноочаговых болезней человека.

Возбудители ГЛПС — хантавирусы, в соответствии с современной классификацией,

в составе семейства *Hantaviridae* входят в отряд *Bunyavirales*.

Около 98% случаев ГЛПС, официально зарегистрированных в Российской Федерации, вызывает вирус Пуумала. Остальные 2% случаев этиологически обусловлены вирусами Хантаан, Амур, Сеул и двумя подтипами Куркино и Сочи вируса Добрава/Белград [4, 16]. Многообразие клинических проявлений, встречающихся в дебюте болезни также при целом ряде дру-

гих заболеваний, определяет высокую значимость специфической диагностики ГЛПС. Иммунологические методы являются основными в специфической лабораторной диагностике ГЛПС. Использование молекулярных методов (ПЦР) ограничивается коротким периодом времени, невысоким количественным содержанием вирусной РНК в крови и низкой чувствительностью тест-систем.

Непрямой метод флюоресцирующих антител (МФА) оказался определяющим в открытии возбудителей ГЛПС [15] и одним из первых методов, разработанных для иммунологической диагностики хантавирусных инфекций [1, 6].

К настоящему времени в арсенале диагностических препаратов для серодиагностики хантавирусных инфекций (выявление специфических иммуноглобулинов классов М, G и А) существует большое разнообразие методов иммуноферментного анализа (ИФА), основанных на рекомбинантных антигенах, полученных в различных экспрессионных системах [8, 10, 11, 13, 18]. Разработаны диагностические тест-системы, основанные на методах иммунохроматографии и иммуноблоттинга [7, 12]. Диагностическую значимость для серодиагностики ГЛПС имеет выявление в ранней стадии заболевания специфических IgM-антител, которые в большинстве случаев не определяются через 2–3 месяца после окончания острой фазы заболевания. Вместе с тем, в некоторых случаях продуцирование IgM-антител продолжается и до 2-х лет после острой фазы болезни. Дополнительные проблемы метода ИФА обусловлены неспецифическими реакциями, проявляющимися в виде ложноположительных или ложноотрицательных результатов [9]. В то же время непрямой метод иммунофлюоресценции для выявления антител к хантавирусам остается по-прежнему наиболее специфичным, уступая в этом отношении лишь реакции нейтрализации вируса [9].

Цель исследования — уточнение диагностической значимости выявления специфических антител к хантавирусам в моче у больных с подозрением на ГЛПС.

Материалы и методы

Для определения сроков появления и исчезновения антител к хантавирусам в моче больных ГЛПС были собраны 293 пробы мочи от 68 пациентов, поступивших в ГБУЗ Республиканскую клиническую инфекционную больницу № 4 г. Уфы. От каждого больного собирали от 3 до 6 проб мочи при поступлении и далее с 2-дневным интервалом до выписки из стационара. Помимо материала от больных, были исследованы сыворотки крови и пробы мочи, взя-

тые через 1, 2, 3, 6 месяцев от начала заболевания от 15 реконвалесцентов ГЛПС тоже из г. Уфа. Кроме того, были исследованы сыворотки крови от 53 больных ГЛПС из стационаров Москвы, Московской и Самарской областей, главным образом с целью серотипирования антител для установления видовой принадлежности хантавируса — возбудителя ГЛПС, и пробы мочи, взятые (параллельно с сыворотками крови) в различные сроки от начала болезни.

Исследования на присутствие антихантавирусных антител (суммарно IgM и IgG) проводили методом МФА с использованием поливалентного «Диагностикума ГЛПС» («Диагностикум геморрагической лихорадки с почечным синдромом культуральный, поливалентный для непрямого метода иммунофлюоресценции» производства ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») по инструкции производителя. Для серотипирования антител использовали культуральные моновалентные антигенные препараты, приготовленные на основе вирусов Пуумала и Добrava/Белград. Мочу для исследования в МФА предварительно концентрировали в 10 раз. Для этого 1 мл мочи центрифугировали 15 мин при 8000 об/мин, после чего верхние 900 мкл аккуратно удаляли и оставшиеся 100 мкл ресуспендировали. Сконцентрированный образец мочи исследовали в двукратных разведениях, начиная с исходного. Значения количественных данных выражали в виде средних величин \pm стандартное отклонение. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 (San Diego, CA 92108). Для оценки взаимосвязи величин титра антител в сыворотке крови и моче определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена — r_s . В зависимости от знака (+) или (–) корреляцию оценивали как прямую или обратную соответственно. Силу взаимосвязи определяли по величине коэффициента r_s . Сила взаимосвязи при $r_s < 0,19$ — очень слабая, $r_s = 0,2–0,29$ — слабая; $r_s = 0,3–0,49$ — умеренная.

Результаты и обсуждение

В результате серологического типирования антител в сыворотках крови больных ГЛПС было установлено, что все исследованные нами случаи ГЛПС были вызваны вирусом Пуумала.

Для определения динамики титра антител в моче проанализировано 345 проб мочи, взятых от 110 больных с 3 по 30 день болезни, в том числе 293 пробы мочи, взятых в динамике от 68 больных (инфекционная больница № 4 г. Уфы). На 3, 4 и 5 день болезни антитела в моче определили у 85,7, 89,4 и 93,1% больных соответственно. С 6 дня болезни антитела в моче определя-

Таблица 1 Динамика выявления хантавирусных антител в моче больных ГЛПС

Table 1. Dynamics of urine hantavirus-specific antibodies in HFRS patients

День болезни Day after disease onset		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12–15	16–20	21–25	26–30
Обследовано проб Samples examined		7	19	29	20	31	24	29	26	22	64	40	22	26
АТ* Ab*	абс. abs.	6	17	27	20	31	24	29	26	21	64	39	22	24
	%	86	89	93	100	100	100	100	100	96	100	97,5	100	92,3

Примечание. АТ — количество проб с хантавирусными антителами.

Note. Ab — number of samples positive for hantavirus antibodies.

лись у 100% обследованных больных. За период пребывания в стационаре антитела в моче перестали обнаруживаться на 11 день болезни у 1 из 22, на 20 день — у 1 из 40 и у 2 из 26 пациентов на 30-й день болезни (табл. 1).

Ранее было показано, что с использованием «Диагностикума ГЛПС» специфические антитела в моче больных ГЛПС, сконцентрированной в 10 раз, обнаруживались в 88,9% случаев с 3 по 21 день от начала лихорадки [5].

В данном исследовании детальный анализ динамики антихантавирусных антител в моче больных ГЛПС показал, что с 6 по 11 день с начала заболевания антитела определялись у 100% больных, а с 12 по 30 день, практически до выписки из стационара, — у 98% больных (табл. 1, рис. 1).

Для определения длительности периода экскреции антител с мочой исследовали пробы мочи, взятые от 15 реконвалесцентов через 1, 2,

3 и 6 месяцев от начала заболевания. На фоне незначительного снижения титра антител в крови, присутствие антител в моче выявлено у 13 пациентов (86,7%) через 1 месяц, у 7 пациентов (46,7%) через 2 месяца и у 3 пациентов (20%) через 3 месяца. Как видно из табл. 2, присутствие антител в моче реконвалесцентов ГЛПС к 6-му месяцу от начала заболевания не было установлено.

С целью определения количественного содержания антител, экскретируемых с мочой, были исследованы методом титрования 345 проб мочи от 83 пациентов. Наиболее высокое содержание выделяемых с мочой специфических иммуноглобулинов отмечали с 5 по 11 сутки от начала лихорадки (рис. 2), что соответствует олигурическому периоду болезни.

Для уточнения зависимости количества выделяемых с мочой антител от титра антител, циркулирующих в крови пациентов, были па-

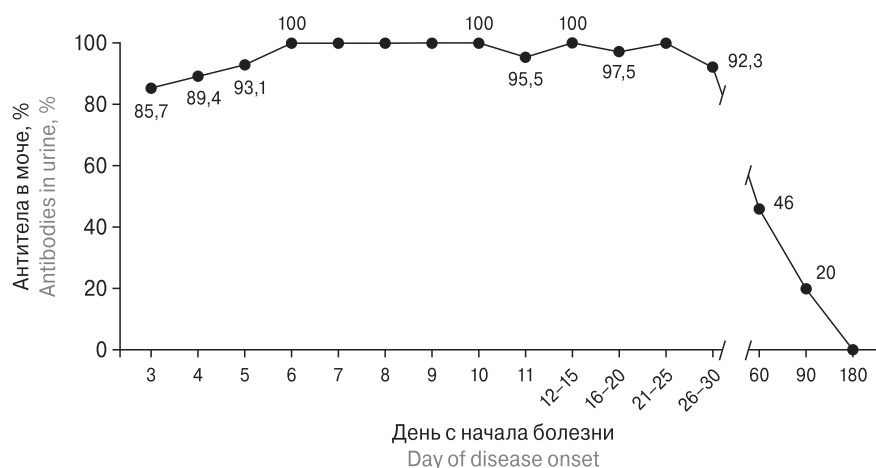
**Рисунок 1.** Выявление антител к хантавирусам в моче больных и реконвалесцентов ГЛПС

Figure 1. Hantavirus antibodies detection in the urine of HFRS patients and convalescents

Примечание. Во временном промежутке 12–15, 16–20, 21–25, 26–30 процент проб мочи, содержащих антихантавирусные антитела, подсчитан относительно числа проб, взятых от больных в этом периоде болезни.

Note. In the time interval 12–15, 16–20, 21–25, 26–30, the percentage of urine samples containing anti-hantavirus antibodies is calculated relative to the number of samples taken from patients in this period of the disease.

Таблица 2 Выявление специфических антител в крови и моче реконвалесцентов ГЛПС

Table 2. Hantavirus antibodies detection in the blood and urine of HFRS convalescents

№ пациента Patient's no.	Титр антител (МФА) Antibody titer (IFA)							
	1 месяц 1 month		2 месяца 2 months		3 месяца 3 months		6 месяцев 6 months	
	кровь blood	моча urine	кровь blood	моча urine	кровь blood	моча urine	кровь blood	моча urine
2	32 000	8	32 000	4	32 000	0	32 000	0
6	32 000	2	32 000	4	32 000	1	32 000	0
7	16 000	2	16 000	1	16 000	2	16 000	0
12	64 000	4	32 000	0	32 000	0	н/и n/i	н/и n/i
14	32 000	4	32 000	0	32 000	0	н/и n/i	н/и n/i
19	64 000	16	64 000	0	64 000	0	н/и n/i	н/и n/i
20	32 000	4	64 000	0	64 000	0	64 000	0
23	64 000	4	64 000	8	32 000	0	32 000	0
26	64 000	0	64 000	0	1024	0	1024	0
28	128 000	2	32 000	2	32 000	2	32 000	0
30	64 000	8	64 000	0	64 000	0	н/и n/i	н/и n/i
33	64 000	4	32 000	4	32 000	0	32 000	0
45	128 000	0	32 000	0	32 000	0	н/и n/i	н/и n/i
46	32 000	2	16 000	2	16 000	0	н/и n/i	н/и n/i
58	128 000	4	64 000	0	32 000	0	н/и n/i	н/и n/i
АТ в моче Ab in urine	13/15 (86,7%)		7/15 (46,7%)		3/15 (20%)		0	

Примечание: н/и — не исследовали.

Note. n/i — not investigated.

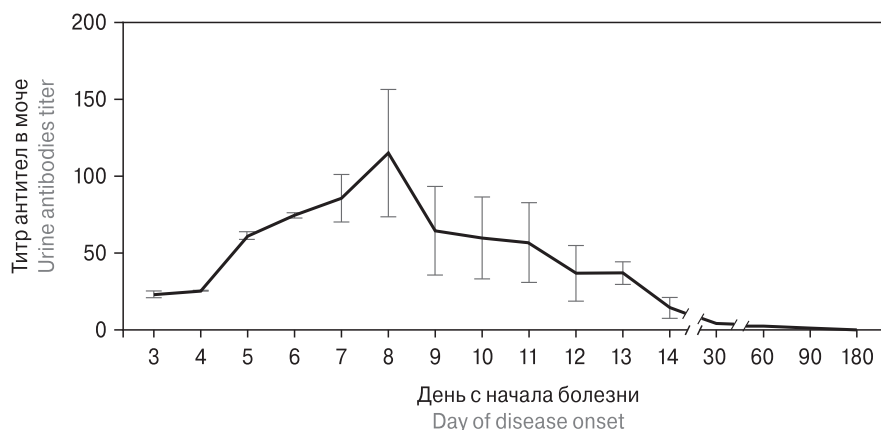
**Рисунок 2.** Зависимость количества экскретируемых с мочой антител от времени, прошедшего с начала заболевания

Figure 2. Dependence of the urine excreted antibodies on the disease onset

Примечание. Градация на оси абсцисс имеет условный характер.

Note. The gradation on the X-axis has conditional character.

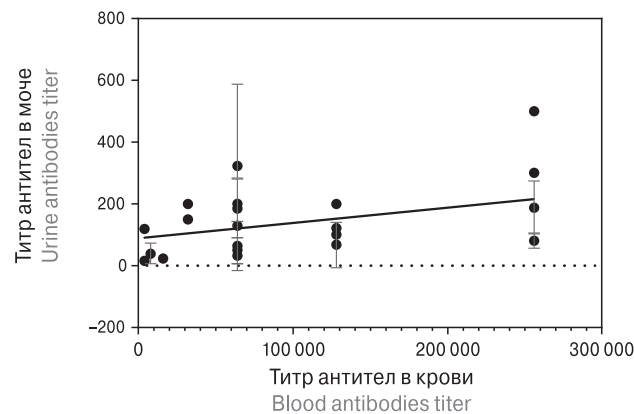


Рисунок 3. Корреляционная зависимость количественного содержания антител, выявленных в сыворотке крови и моче (n = 46) с 5 по 12 сутки (олигурический период болезни)

Figure 3. Correlation of the antibodies quantity detected in the blood serum and urine (n = 46) during the disease oliguric period (from 5 to 12 days)

параллельно обследованы пробы мочи и крови, взятые в один день. Показано, что в олигурическом периоде болезни имеет место умеренная прямая положительная корреляционная зависимость ($r_s = 0,4$) количественного содержания антител в сыворотке крови и моче (рис. 3). Вероятно, это объясняется тем, что в этот период болезни степень повреждения эндотелия почечных капилляров максимально выражена и количество выделяемых с мочой антител, в большинстве случаев, пропорционально их содержанию в крови. В то же время выявлена незначительная отрицательная корреляционная зависимость ($r_s = -0,2$) количественного содержания антител, обнаруженных в сыворотке крови и моче, собранных в интервале с 11 по 28 день болезни. В этом временном интервале степень повреждения капилляров, а также функциональная способность почек имеют широкий диапазон индивидуальных различий. Так, в отдельных случаях даже при невысоких титрах антител в крови их экскреция с мочой была значительной (сильное повреждение капилляров) и наоборот, незначительное количественное содержание антител в моче наблюдалось при их высоких титрах в крови (незначительное повреждение капилляров и менее выраженное нарушение функции почек), что характерно для периода реконвалесценции.

Для серологической диагностики инфекционных заболеваний, в том числе ГЛПС, в настоящее время широко используются иммуноферментные тест-системы. В то же время для хантавирусных инфекций по-прежнему высокоактуальным остается применение непрямого метода иммунофлюоресценции. Диагностическая значимость этого метода обусловлена его высокой специфичностью [9, 14] и простотой исполнения. Специфические

антитела к хантавирусам — возбудителям ГЛПС, очевидно, сохраняются пожизненно [3, 9]. В этой связи диагностическую значимость имеет 4-кратное нарастание титров антител в парных сыворотках крови, взятых с 2–4-дневным интервалом. Это касается как определения антител в МФА (суммарно IgM и IgG), так и антител классов IgG и IgM, выявляемых иммуноферментными методами. Ввиду того, что к 6–8 дню болезни титры антител к хантавирусам, выявляемых МФА, у большинства пациентов выходят на плато [2], при взятии первой сыворотки крови после 6 дня болезни последующее нарастание титра антител может отсутствовать. В этом случае надежным критерием острого периода хантавирусной инфекции является обнаружение антихантавирусных антител одновременно в крови и моче.

В результате настоящего исследования уточнены сроки выявления антител в моче больных ГЛПС как в остром периоде, так в периоды ранней и поздней реконвалесценции. Установлено, что в периоде реконвалесценции выделение антител с мочой продолжалось через 1, 2 и 3 месяца от начала заболевания в 86,7, 46 и 20% случаев соответственно, и лишь через 6 месяцев ни у одного из обследованных больных антитела в моче не удалось обнаружить. Вероятно, эта закономерность отражает процесс длительного восстановления функциональной способности почек. Как известно, в моче в норме присутствуют лишь следы IgG. Обнаружение специфических антител в моче больных ГЛПС свидетельствует о повышении уровня IgG, что указывает на неизбирательную гломерулопатию или смешанную клубочково-канальцевую патологию [17]. Одновременное обнаружение хантавирусных антител в крови и моче лихорадящих больных с помощью

«Диагностикума ГЛПС» является достоверным диагностическим критерием острого периода хантавирусной инфекции, и позволяет установить специфический диагноз при поступлении в стационар на 3, 4, 5, 6–10 день от начала заболевания в 85,7, 89,4, 93,1 и 100% случаев соответственно, не прибегая к иссле-

дованию антител в парных сыворотках крови. Ранняя диагностика ГЛПС позволяет своевременно назначать патогенетическую терапию и определять тактику ведения пациентов, что в значительной степени предупреждает развитие тяжелых осложнений и снижает летальность при этой тяжелой инфекции.

Список литературы/References

1. Дзагурова Т.К., Лещинская Е.В., Ткаченко Е.А., Мясников Ю.А., Загидуллин И.М. Серологическое обследование больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в Европейской части СССР // Вопросы вирусологии. 1983. № 6. С. 676–680. [Dzagurova T.K., Leshchinskaya E.V., Tkachenko E.A., Miasnikov Yu.A., Zagidullin I.M. Serological investigation of hemorrhagic fever with renal syndrome patients in the European part of the USSR. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*, 1983, no. 6, pp. 676–680. (In Russ.)]
2. Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Петров В.А. Эффективность применения культуральных антигенов для серодиагностики ГЛПС с помощью метода иммунофлюоресценции // Вопросы вирусологии. 1988. № 1. С. 71–75. [Dzagurova T.K., Tkachenko E.A., Petrov V.A. The effectiveness of culture antigens for HFRS serodiagnostics by means of the immunofluorescence method. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*, 1988, no. 1, pp. 71–75. (In Russ.)]
3. Мясников Ю.А., Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Резапкин Г.В., Савельева Р.А., Степаненко А.Г., Нургалева Р.Г., Игнатов В.Я. О сроках сохранения антител у реконвалесцентов после геморрагической лихорадки с почечным синдромом в европейских очагах инфекции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1986. № 6. С. 78–80. [Myasnikov Yu.A., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A., Rezapkin G.V., Savelyeva R.A., Stepanenko A.G., Nurgaleeva R.G., Ignatov V.Ya. On the time of preservation of the antibody in convalescents after hemorrhagic fever with the renal syndrome in European foci of infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1986, no. 6, pp. 78–80. (In Russ.)]
4. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации. [Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare. Infectious morbidity in the Russian Federation]. URL: <https://www.rosпотребнадзор.ru/activities/statistics-materials>
5. Шутов А.М., Потрашкова К.И., Прокаева П.К., Лесников И.Р. Диагностическое значение определения в моче антител к вирусу геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Терапевтический архив. 1996. Т. 68, № 11. С. 35–37. [Shutov A.M., Potrashkova K.I., Prokaeva P.K., Lesnikov I.R. Diagnostic value of antibodies determination in the urine of hemorrhagic fever with renal syndrome patients. *Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic Archive*, 1996, vol. 68, no. 11, pp. 35–37. (In Russ.)]
6. Brummer-Korvenkontio M., Vaheri A., Hovi T., Bonsdorff C.H., Vuorimies J., Manni T., Penttinen K., Oker-Blom N., Lähdevirta J. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J. Infect. Dis.*, 1980, no. 41, pp. 131–134. doi: 10.1093/infdis/141.2.131
7. Ivanov A., Vapalahti O., Lankinen H., Tkachenko E., Vaheri A., Niklasson B., Lundkvist Å. Biotin-labeled antigen: a novel approach for detection of Puumala virus-specific IgM. *J. Virol. Methods*, 1996, no. 62, pp. 87–92. doi: 10.1016/0166-0934(96)02090-3
8. Hujakka H., Koistinen V., Eerikainen P., Kuronen I., Laatikainen A., Kauppinen J., Vaheri A., Vapalahti O., Närvänen A. Comparison of a new immunochromatographic rapid test with a commercial EIA for the detection of Puumala virus specific IgM antibodies. *J. Clin. Virol.*, 2001, no. 23, pp. 79–85. doi: 10.1016/s1386-6532(01)00191-3
9. Kruger D.H., Figueiredo L.T.M., Song J.-W., Klempa B. Hantaviruses — globally emerging pathogens. *J. Clin. Virol.*, 2014, no. 64, pp. 128–136. doi: 10.1016/j.jcv.2014.08.033
10. Lee H.W., Lee P.W., Johnson K.M. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.*, 1978, vol. 137, no. 3, pp. 298–308. doi: 10.1093/infdis/137.3.298
11. Meisel H., Wolbert A., Razanskiene A., Marg A., Kazaks A., Sasnauskas K., Pauli G., Ulrich R., Krüger D.H. Development of novel immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM enzyme immunoassays based on recombinant Puumala and Dobrava hantavirus nucleocapsid proteins. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2006, no. 3, pp. 1349–1357. doi: 10.1128/CVI.00208-06
12. Schmaljohn C.S., Chu Y.K., Schmaljohn A.L., Dalrymple J.M. Antigenic subunits of Hantaan virus expressed by Baculovirus and vaccinia virus recombinants. *J. Virol.*, 1990, vol. 64, no. 7, pp. 3162–3170. doi: 10.1128/JVI.64.7.3162-3170.1990
13. Schubert J., Tollmann F., Weissbrich B. Evaluation of a pan-reactive hantavirus enzyme immunoassay and of a hantavirus immunoblot for the diagnosis of nephropathia epidemica. *J. Clin. Virol.*, 2001, no. 21, pp. 63–74. doi: 10.1016/s1386-6532(00)00187-6
14. Sjolander K.B., Elgh F., Kallio-Kokko H., Vapalahti O., Hägglund M., Palmcrantz V., Juto P., Vaheri A., Niklasson B., Lundkvist Å. Evaluation of serological methods for diagnosis of Puumala hantavirus infection (nephropathia epidemica). *J. Clin. Microbiol.*, 1997, vol. 35, no. 2, pp. 3264–3268. doi: 10.1128/JCM.35.12.3264-3268.1997
15. Sonnenberg K., Stoecker W., Lundkvist Å., Vaheri A., Vapalahti O., Chan P.K., Feldmann H., Dick D., Schmidt-Chanasit J., Padula P., Vial P.A., Panculescu-Gatej R., Ceianu C., Heyman P., Avšič-Županc T., Niedrig M. Immunofluorescence assay for the simultaneous detection of antibodies against clinically important old and new world hantaviruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2013, vol. 7, no. 4: e2157. doi: 10.1371/journal.pntd.0002157
16. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., Kurashova S.S., Balkina A.S., Tkachenko P.E., Kruger D.H., Klempa B. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.*, 2019, vol. 25, no. 12, pp. 2325–2328. doi: 10.3201/eid2512.181649

17. Waller K.V., Ward K.M., Mahan J.D., Wismatt D.K. Current concepts in proteinuria. *Clin. Chem.*, 1989, vol. 35, no. 5, pp. 755–765.
18. Zoller L.G., Yang S., Got P., Darai G. A novel mu-capture enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant proteins for sensitive and specific diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, vol. 31, no. 5, pp. 1194–1199. doi: 10.1128/JCM.31.5.1194-1199.1993

Авторы:

Дзагурова Т.К., д.м.н., зав. лабораторией геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

Мурзабаева Р.Т., д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней Башкирского государственного медицинского университета, г. Уфа, Россия;

Кутлугужина Ф.Г., зав. диагностическим отделением ГБУЗ Республиканская клиническая больница, г. Уфа, Россия;

Морозов В.Г., д.м.н., профессор, директор ООО Медицинская компания «Гепатолог», г. Самара, Россия;

Вольных Э.В., зав. инфекционным отделением ГБУЗ СО Новокуйбышевская центральная городская больница, г. Новокуйбышевск, Самарская область, Россия;

Курашова С.С., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

Баловнева М.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

Ткаченко П.Е., к.м.н., ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия;

Ишмухаметов А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, генеральный директор ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия; руководитель кафедры организации и технологии иммунобиологических препаратов ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия;

Белякова А.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

Ткаченко Е.А., д.м.н., профессор, руководитель научного направления ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия.

Authors:

Dzagurova T.K., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

Murzabaeva R.T., PhD, MD (Medicine), Professor, Infectious Disease Department, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;

Kutluguzhina F.G., Head of the Diagnostic Department, Republic Clinical Diseases Hospital, Ufa, Russian Federation;

Morozov V.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Medical Company “Hepatolog”, Samara, Russian Federation;

Volnyh E.V., Head of the Infectious Diseases Department, Novokuibyshevsk Central City Hospital, Novokuibyshevsk, Samara Region, Russian Federation;

Kurashova S.S., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

Balovneva M.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

Tkachenko P.E., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Internal Diseases Propaedeutics, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Ishmukhametov A.A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, General Director, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation; Head of the Department of Organization and Research of Immunobiological Technologies, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Belyakova A.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

Tkachenko E.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Scientific Supervisor, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation.

ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ОПАСНОСТИ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ ДВУХ БОЛЬНИЧНЫХ СТАЦИОНАРОВ г. ХАБАРОВСКА В ПЕРИОД НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (ДЕКАБРЬ 2020 г. — МАРТ 2021 г.)

О.Е. Троценко¹, А.П. Бондаренко¹, Н.Ю. Пшеничная², Т.А. Зайцева³, Ю.А. Гарбуз⁴,
И.В. Чишагорова⁴, В.А. Шмыленко¹, Е.А. Базыкина¹, О.Н. Огиенко¹

¹ ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия

² ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ Управление Роспотребнадзора по Хабаровскому краю, г. Хабаровск, Россия

⁴ ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае, г. Хабаровск, Россия

Резюме. Микробиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями предполагает одновременный поиск возбудителей у больных и в больничной среде. Цель настоящего исследования — с помощью методов эпидемиологического и бактериологического анализа дать оценку потенциальной опасности больничной среды двух инфекционных стационаров г. Хабаровска, развернутых в период пандемии новой коронавирусной инфекции. **Материалы и методы.** Проведено бактериологическое исследование назофарингеальной флоры пациентов с внебольничной пневмонией (241 человек), госпитализированных в два лечебно-профилактических учреждения (ЛПУ) г. Хабаровска. Одновременно осуществлен санитарно-бактериологический контроль больничной среды (428 проб смывов и 91 проба воздуха). Бактериологические исследования выполнены классическим методом. Идентификацию выделенных возбудителей и определение их чувствительности к антибиотикам проводили на бактериологическом анализаторе Vitek 2 Compact. **Результаты.** Из 428 проб смывов патогенные биологические агенты 9 наименований (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus haemolyticus*) выделены в 20 пробах — в 4,7% [2,7–6,7] случаев. В половине этих случаев — 10 из 20 изолятов, или 2,3% [0,9–3,8] — идентифицированы лекарственно-устойчивые штаммы, в том числе 5 карбапенем-устойчивых изолятов (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) и 5 изолятов с множественной лекарственной устойчивостью (*Enterobacter cloacae*, *Pantoea*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus haemolyticus*). В 6 из 91 пробы воздуха выделены патогенные биологические агенты (6,6% [1,5–11,7]), в том числе в половине случаев (3,3% [0,6–7,9]) идентифицированы ЛУ-варианты — *S. aureus* и *S. haemolyticus*. Из двух больничных учреждений одно (ЛПУ № 1) признано более опасным, так как флора с высоким патогенным потенциалом выделена в РАО (*A. baumannii* и *P. aeruginosa*, устойчивые к цефалоспорином III–IV поколений и к карбапенемам). **Заключение.** Установленная нами циркуляция большого

Адрес для переписки:

Троценко Ольга Евгеньевна
680000, Россия, г. Хабаровск, ул. Шевченко, 2,
ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии
и микробиологии Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (421) 232-52-28. E-mail: alyonaf@yandex.ru

Contacts:

Olga E. Trotsenko
680000, Russian Federation, Khabarovsk, Shevchenko str., 2,
Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology
of the Rosпотребнадзор.
Phone: +7 (421) 232-52-28. E-mail: alyonaf@yandex.ru

Для цитирования:

Троценко О.Е., Бондаренко А.П., Пшеничная Н.Ю., Зайцева Т.А.,
Гарбуз Ю.А., Чишагорова И.В., Шмыленко В.А., Базыкина Е.А.,
Огиенко О.Н. Оценка потенциальной опасности внешней
среды двух больничных стационаров г. Хабаровска в период
новой коронавирусной инфекции (декабрь 2020 г. — март
2021 г.) // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 535–542.
doi: 10.15789/2220-7619-EOT-1844

Citation:

Trotsenko O.E., Bondarenko A.P., Pshenichnaya N.Yu., Zaitseva T.A., Garbuz Yu.A.,
Chishagorova I.V., Shmylenko V.A., Bazykina E.A., Ogienko O.N. Evaluation of the
two in-patient hospitals on potential environmental hazard during the period of new
coronavirus infection in the Khabarovsk city (december 2020 — march 2021) //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12,
no. 3, pp. 535–542. doi: 10.15789/2220-7619-EOT-1844

перечня микроорганизмов во внешней среде двух стационаров обеспечивает высокий риск заражения пациентов из больничной среды. В отделениях реанимации и интенсивной терапии, где больше всего тяжелых больных («основной резервуар» антибиотикорезистентных штаммов), формируются условия для нозокомиальных инфекций.

Ключевые слова: ЛПУ, внебольничная пневмония, бактериальная флора, больничная среда, риск инфицирования.

EVALUATION OF THE TWO IN-PATIENT HOSPITALS ON POTENTIAL ENVIRONMENTAL HAZARD DURING THE PERIOD OF NEW CORONAVIRUS INFECTION IN THE Khabarovsk CITY (DECEMBER 2020 — MARCH 2021)

Trotsenko O.E.^a, Bondarenko A.P.^a, Pshenichnaya N.Yu.^b, Zaitseva T.A.^c, Garbuz Yu.A.^d, Chishagorova I.V.^d, Shmylenko V.A.^a, Bazykina E.A.^a, Ogienko O.N.^a

^a Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumers Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), Khabarovsk, Russian Federation

^b Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumers Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), Khabarovsk, Russian Federation

^c Khabarovsk Krai Rospotrebnadzor Regional Office, Khabarovsk, Russian Federation

^d Center of Hygiene and Epidemiology of Khabarovsk Krai, Khabarovsk, Russian Federation

Abstract. Microbiological monitoring after infectious diseases in the system of epidemiological surveillance implies simultaneous pathogen identification both among patients and in hospital environment. Our aim is to assess potential hospital environmental hazard for the two in-patient infectious disease hospitals of the Khabarovsk city by using bacteriological and epidemiological analysis during new coronavirus disease pandemic. *Materials and methods.* Bacteriological assessment of nasopharyngeal microflora in 241 patients suffering from community-acquired pneumonia that were hospitalized in the two prevention and treatment facilities of the Khabarovsk city was performed. Sanitary-bacteriological control of hospital environment (428 hospital environment samples and 91 air samples) was carried out in parallel. Bacteriological assessment was performed with classical methods. Identification of isolated bacteriological pathogens and evaluation of drug-resistant strains were carried out by utilizing bacteriological analyzer Vitek 2 Compact. *Results.* Nine different pathogens (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus haemolyticus*) were isolated in 20 out of 428 samples — 4.7% [2.7–6.7]. Half of isolated agents — 2.3% [0.9–3.8] — were represented by drug-resistant isolates (10 out of 20 isolates) including 5 carbapenem-resistant isolates (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) and 5 isolates with multiple drug resistance (*Enterobacter cloacae*, *Pantoea*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus haemolyticus*). Air samples contained pathogenic biological agents found in 6 out of 91 samples — 6.6% [1.5–11.7], and half of them — 3.3% [0.6–7.9] — were identified as drug-resistant variants, including *S. aureus* и *S. haemolyticus*. One of the surveyed hospitals was recognized as more hazardous due to microflora isolated from intensive care unit (*A. baumannii* and *P. aeruginosa* were resistant to 3rd–4th generation cephalosporins and carbapenems). *Conclusion.* Revealed circulation of wide range of microorganisms isolated from environment of two in-patient hospitals indicates high risk of healthcare-associated infections formation. Intensive care units can serve as a reservoir of healthcare-associated infections due to high percentage of patients with severe disease cases (“main reservoir” of drug-resistant strains).

Key words: prevention and treatment facility, community-acquired pneumonia, bacterial microflora, hospital environment, risk of infection.

Введение

Микробиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями предполагает одновременный поиск возбудителей в клинических пробах больных и выделение патогенных биологических агентов (ПБА) из больничной среды, проводимые с целью оценки загрязненности объектов внешней среды стационаров и риска внутрибольничного инфицирования, ведущего к развитию инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП).

Микроорганизмы в лечебно-профилактических учреждениях (ЛПУ) могут стать госпи-

тальными штаммами и вызывать внутрибольничные инфекции. Большой арсенал адаптационных механизмов у бактерий обуславливает возможность формирования госпитальных штаммов, устойчивых к антимикробным препаратам (АМП), дезинфицирующим средствам, кожным антисептикам и одновременно обладающих признаками высокой вирулентности [2]. Множество факторов вносит свой вклад в распространение антибиотикорезистентных бактерий. Важное условие — селективное давление, возникающее из-за широкого использования АМП. Дальнейшее формирование госпитальных штаммов — сложный многоступенчатый биологический процесс, проходящий как

во внешней среде стационара, сопровождающийся приобретением устойчивости к дезинфектантам, другим неблагоприятным факторам внешней среды, так и в организме пациента с приобретением факторов вирулентности путем горизонтального переноса генетической информации.

В литературе активно обсуждается вопрос об основных источниках инфицирования больных в госпитальной среде, которая является отдельной экосистемой [1, 4, 8]. Основными категориями источников ИСМП являются пациенты, объекты окружающей среды и медицинские работники [3, 7]. Однако, как полагает Н.М. Коза (2013) [7], именно пациенты являются наиболее значимой категорией источников инфекций в больничных условиях. При этом пациенты, имеющие клинически выраженную инфекцию, а также бессимптомные носители инфекций, колонизированные ПБА, представляют угрозу и для других пациентов, а также медицинского персонала (экзогенное заражение), и для самих себя (эндогенная инфекция).

Окружающая среда в госпитальной эпидемиологии трактуется не только как фактор передачи инфекции, но и как ее источник. Особое значение имеет диагностическое и лечебное оборудование, контаминированное ПБА [5, 9]. Медицинский персонал в качестве источника инфекции опасен только при формировании у него носительства ПБА и служит в основном механическим переносчиком инфекции [7].

Цель исследования — с помощью методов эпидемиологического и бактериологического анализа дать оценку потенциальной опасности больничной среды двух инфекционных стационаров г. Хабаровска, развернутых в период пандемии новой коронавирусной инфекции.

Материалы и методы

Проведено бактериологическое исследование клинических проб (назофарингеальные мазки) от 241 пациента с внебольничной пневмонией (ВП) из двух стационаров г. Хабаровска, развернутых в разное время для приема больных новой коронавирусной инфекцией.

ЛПУ № 1 — многопрофильное лечебное учреждение, рассчитанное на 630 коек; имеет в своем составе реанимационное отделение (РАО) на 39 мест, с апреля 2020 г. полностью перепрофилировано под инфекционный госпиталь. Среди наблюдаемых 110 больных 25 человек — пациенты РАО.

ЛПУ № 2 — многопрофильная больница, имеет в своем составе 22 отделения на 720 коек; с сентября 2020 г. в ней развернуты 450 коек для инфекционных больных ВП; имеет в своем со-

ставе РАО (23 койки), однако среди наблюдаемых нами больных (131 человек) не было пациентов РАО.

Всего была исследована бактериальная назофарингеальная флора 241 больного ВП. Исследование выполнялось в соответствии с нормативными документами (МР 4.2.014-16 «Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии», МУ 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний»).

Одновременно в двух лечебных учреждениях осуществляли санитарно-бактериологический контроль (смывы с объектов внешней среды и исследование проб воздуха) для оценки потенциальной опасности больничной среды.

Всего в период с декабря 2020 г. по март 2021 г. было сделано по 12 выходов в каждое ЛПУ. При еженедельном заборе образцов исследовано 428 смывов и 91 проба воздуха. Отбор проб больничной среды выполняли в соответствии с нормативным документом (МУК 4.2.2942-11 «Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях»). Бактериологическое исследование отобранных проб проводили классическим культуральным методом. Идентификацию выделенных культур и определение их чувствительности к АМП осуществляли с использованием микробиологического анализатора Vitek 2 Compact.

Статистическая обработка осуществлялась с помощью программы Statistica 6.0. Анализ результатов проводился с использованием непараметрических методов статистической обработки (критерий Хи-квадрат, в том числе с поправкой Йейтса, и точный критерий Фишера). Для полученных данных рассчитывался доверительный интервал (95% ДИ). В случае, если уровень значимости отличий составлял менее 0,05, разница между изучаемыми показателями считалась достоверной.

Результаты

Из 428 проб смывов ПБА выявлены в 20 пробах (4,7% [2,7–6,7]). В половине этих случаев (2,3% [0,9–3,8]) идентифицированы лекарственно-устойчивые варианты (10 из 20 изолятов). В числе 20 изолятов — 2 штамма из грамположительной флоры (*S. haemolyticus*, *Enterococcus* spp.), 11 штаммов энтеробактерий (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pantoea* spp.), 7 штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий (комплекс *Pseudomonas* spp., комплекс *Acinetobacter baumannii*). Лекарственно-устойчивые варианты (10 изолятов) представлены комплексом *S. haemolyticus*, *E. faecium*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. agglomerans*,

P. aeruginosa, *A. baumannii*. В том числе у 5 изолятов (комплекс *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*) установлена устойчивость к карбапенемам.

Из 91 пробы воздуха ПБА выделены в 6 пробах (6,6% [1,5–11,7]). Бактериальная флора представлена 5 штаммами *S. aureus* и 1 штаммом *S. haemolyticus*, в том числе в половине случаев идентифицированы лекарственно-устойчивые варианты (MRSA, MRKNS).

В табл. 1 представлены результаты исследования 428 проб смывов и 91 пробы воздуха — суммарно и отдельно по двум учреждениям, частота выявления ПБА и их спектр для ЛПУ № 1 и ЛПУ № 2.

В табл. 2 представлена характеристика объектов внешней среды двух больничных учреждений с положительными результатами бактериологического исследования.

В табл. 3 представлены сравнительные материалы по бактериальной флоре респираторного тракта 241 больного, находившегося на лечении

в ЛПУ № 1 и ЛПУ № 2, и флоре больничной среды двух лечебных учреждений. Как свидетельствуют данные таблицы, состав возбудителей, выделенных из внешней среды, отражает состав ПБА, выделенных от больных, и подтверждает факт того, что источниками инфицирования внешней среды ЛПУ являются пациенты. Из табл. 3 также следует, что перечень возбудителей, выявляемых от больных, значительно шире, чем из внешней среды ($\chi^2 = 7,0$; $p = 0,009$).

Обсуждение

Несмотря на более низкие показатели выявления ПБА в смывах в ЛПУ № 1 — 2,7% [0,9–5,5] против 6,25% [3,2–9,3] в ЛПУ № 2, а также на тот факт, что в ЛПУ № 2 более половины штаммов — 53,3% [28,4–76,8] — оказались с лекарственно-устойчивыми маркерами (в том числе в двух случаях выделены *K. pneumoniae*), фенотипически проявляющими себя как продуценты БЛРС, устойчивые к карбапенемам (штаммы

Таблица 1. Результаты исследования смывов с объектов внешней среды (n = 428) и проб воздуха (n = 91), отобранных в двух лечебных учреждениях г. Хабаровска в период пандемии новой коронавирусной инфекции (декабрь 2020 — март 2021 г.)

Table 1. Results of examining external environment (n = 428) and air samples (n = 91) collected in the two healthcare facilities of the Khabarovsk city during COVID-19 pandemic (December 2020 — March 2021)

Выделенные ПБА Isolated pathogenic biological agents	ЛПУ № 1 Healthcare facility No. 1		ЛПУ № 2 Healthcare facility No. 2		Всего Total	
	СМЫВЫ washoffs	ВОЗДУХ air	СМЫВЫ washoffs	ВОЗДУХ air	СМЫВЫ washoff	ВОЗДУХ air
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	4 (1MRSA)	–	1R MRSA	–	5 (2MRSA)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	–	1R	1R	–	1R	1R
<i>Enterococcus faecium</i>	–	–	1R	–	1R	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	–	2 Carb+	–	2 Carb+	–
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	–	–	–	1	–
<i>Pantoea</i> spp.	2	–	3 (в т.ч. 2R) 3 (including 2R)	–	5 (в т.ч. 2R) 5 (including 2R)	–
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	–	–	3 (в т.ч. 1R) 3 (including 1R)	–	3 (в т.ч. 1R) 3 (including 1R)	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 Carb+	–	–	–	1 Carb+	–
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	–	–	1	–	1	–
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	1 Carb+	–	4 (в т.ч. 1 Carb+) 4 (including 1 Carb+)	–	5 (в т.ч. 2 Carb+) 5 (including 2 Carb+)	–
Число и % проб с выделенным ПБА Number and % of samples contaminated with pathogenic biological agents	5 2,7% [0,9–5,5]	5 11,6% [3,9–22,7]	15 6,25% [3,2–9,3]	1 2,1% [0,3–2,2]	20 4,7% [2,7–6,7]	6 6,6% [1,5–11,7]
Из них с лекарственной устойчивостью Of them with drug resistance	2 1,1% [0,1–3,1]	2 4,7% [0,5–12,9]	8 3,3% [1,4–5,9]	1 2,1% [0,3–2,2]	10 2,3% [0,9–3,8]	3 3,3% [0,6–7,9]
Всего проб Total number of samples	188 100%	43 100%	240 100%	48 100%	428 100%	91 100%

Примечания. В квадратных скобках указан 95% доверительный интервал; R — антибиотикорезистентные штаммы; Carb+ — карбапенем-устойчивый вариант.

Notes. 95% confidence interval is shown in square brackets; R — drug resistant strains; Carb+ — carbapenem-resistant variants.

Таблица 2. Характеристика объектов внешней среды двух больничных учреждений с положительными результатами бактериологического исследования (смывы, воздух), выполненного в период пандемии новой коронавирусной инфекции (декабрь 2020 — март 2021) (n = 26)

Table 2. Characteristics of external environment objects in the two healthcare facilities positive for bacteriological examination (washoffs, air samples) conducted during COVID-19 pandemic (December 2020 — March 2021) (n = 26)

№ No.	Наименование ПБА Pathogenic biological agents	Число изолятов Number of isolates	ЛПУ № 1 Healthcare facility No. 1	ЛПУ № 2 Healthcare facility No. 2
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	3 воздух (S) 3 air samples (S) 1 воздух (R) 1 air sample (R)	воздух (п. 231) (R) air samples (ward 231) (R)
2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	1 воздух (R) 1 air sample (R)	1 смыв с прикроватной тумбы (п. 231) (R) 1 washoff from bedside cabinet (ward 231) (R)
3	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	5	1 смыв в РАО (кислородная маска) (Carb+) 1 washout from ICU (oxygen mask) (Carb+)	1 смыв с раковины (S) 1 washoff from sink (S) 1 смыв с кровати (п. 232) (S) 1 washoff from bed surface (ward 232) (S) 1 смыв с кровати (п. 233) (R) 1 washoff from bed surface (ward 233) (R) 1 смыв с обеденного стола (п. 237) (S) 1 washoff from the dining table (ward 237) (S)
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1 смыв в РАО (кислородная маска) (ESBL+; Carb+) 1 washoff from ICU (oxygen mask) (ESBL+; Carb+)	
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2		1 смыв с кислородного штуцера (п. 233) (ESBL+; Carb+) 1 washoff from oxygen tap nozzle (ward 233) (ESBL+; Carb+); 1 смыв с прикроватной тумбы (п. 233) (Carb+) 1 washoff from bedside cabinet (ward 233) (Carb+)
6	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1 смыв с прикроватной тумбы (S) 1 washoff from bedside cabinet (S)	
7	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	3		1 смыв с рожков крана в палате (п. 235) (R) 1 washoff from spout (ward 235) (R) 1 смыв с прикроватной тумбы (п. 234) (S) 1 washoff from bedside cabinet (ward 234) (S) 1 смыв с прикроватной тумбы (п. 231) (S) 1 washoff from bedside cabinet (ward 231) (S)
8	<i>Pantoea</i> spp.	5	1 смыв с защитной маски (R) 1 washoff from safety mask (R) 1 смыв с кровати (S) 1 washoff from bed surface (S)	1 смыв с кровати (п. 231) (R) 1 washoff from bed surface (ward 231) (R) 1 смыв с кровати (п. 234) (R) 1 washoff from bed surface (ward 234) (R) 1 смыв с ручки двери туалета (п. 232) (S) 1 washoff from lavatory door knob (ward 232) (S)
9	<i>Enterococcus faecium</i>	1	–	1 смыв с прикроватной тумбы (п. 237) (R) 1 washoff from bedside cabinet (ward 234) (R)
10	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	–	1 смыв с кислородной маски (п. 232) (S) 1 washoff from oxygen mask (ward 232) (S)
Итого/Total		26	–	–

Примечание. R — антибиотикорезистентные штаммы; S — чувствительные к антибиотикам штаммы; Carb+ — карбапенем-устойчивый вариант; ESBL+ — продуцент β-лактамазы расширенного спектра.

Note. R — drug resistant strains; S — susceptible to drugs strains; Carb+ — carbapenem-resistant variant; ESBL+ — extended-spectrum beta lactamases.

Таблица 3. Структура изолятов, выделенных от больных (312 изолятов) и из внешней среды (20 изолятов из смывов и 6 изолятов из воздуха)

Table 3. Pattern of pathogens isolated from patients (312 isolates) and external environment (20 isolates — from washoff and 6 isolates — from air sampling)

Наименование ПБА Pathogenic biological agent name	Штаммы от больных Strains from patients		Штаммы из смывов Strains from washoffs		Штаммы из воздуха Strains from air samples	
	всего (абс., %) total (abs., %)	в т.ч. R including R	всего (абс., %) total (abs., %)	в т.ч. R including R	всего (абс., %) total (abs., %)	в т.ч. R including R
<i>S. pneumoniae</i>	13 4,2 [1,9–6,4]	0	0	0	0	0
<i>H. influenzae</i>	9 2,9 [1,0–4,7]	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	18 5,8 [3,2–8,4]	7	0	0	5 83,3 [46,4–99,9]	2
<i>S. epidermidis</i>	25 8,0 [5,0–11,0]	25	0	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	21 6,7 [4,0–9,5]	21	1 5,0 [2,2–8,2]	1	1 16,70 [0,9–46,2]	1
<i>Enterococcus spp.</i>	6 1,9 [0,4–3,4]	0	1 5,0 [2,2–8,2]	1	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	29 9,3 [6,1–12,5]	18	2 10,0 [1,0–26,5]	2	0	0
<i>K. oxytoca</i>	0	0	1 5,0 [2,2–8,2]	0	0	0
<i>E. coli</i>	7 2,2 [0,6–3,9]	3	0	0	0	0
<i>Enterobacter spp.</i>	10 3,2 [1,3–5,2]	2	3 15,0 [3,2–33,5]	1	0	0
<i>P. mirabilis</i>	3 1,0 [0,2–2,4]	1	0	0	0	0
<i>M. morgani</i>	4 1,3 [0,3–2,9]	1	0	0	0	0
<i>Serratia spp.</i>	2 0,60 [0,05–1,76]	2	0	0	0	0
<i>Raultella spp.</i>	1 0,3 [0,1–0,5]	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter spp.</i>	3 1,0 [0,2–2,4]	0	0	0	0	0
<i>Pantoea spp.</i>	1 0,3 [0,1–0,5]	0	5 25,0 [9,0–45,7]	2	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	6 1,9 [0,4–3,4]	4	1 5,0 [2,2–8,2]	1	0	0
<i>P. stutzeri</i>	0	0	1 5,0 [2,2–8,2]	0	0	0
<i>A. baumannii complex</i>	11 3,5 [1,5–5,6]	10	5 25,0 [9,0–45,7]	2	0	0
<i>S. maltophilia</i>	3 1,0 [0,2–2,4]	1	0	0	0	0
<i>C. indologenes</i>	4 1,3 [0,3–2,9]	4	0	0	0	0
<i>Candida spp.</i>	136 43,6 [38,1–49,1]	0	0	0	0	0
Всего Total	312 100,0	99 31,7	20 100,0	10 50,0	6 100,0	3 50,0

Примечание. В квадратных скобках указан 95% доверительный интервал.

Note. 95% confidence interval is shown in square brackets.

выделены из кислородного штуцера и прикроватной тумбочки в одной и той же палате в разные дни отбора проб ($\chi^2 = 2,3$; $p > 0,05$), из двух больничных учреждений, находящихся под наблюдением, ЛПУ № 1 признано потенциально более опасным, чем ЛПУ № 2, с учетом следующих факторов:

1. выделение в смывах РАО ЛПУ № 1 карбапенем-резистентных, с сочетанной устойчивостью к цефалоспорином III–IV поколения и фторхинолонам, эпидемиологически значимых ПБА комплекса *Acinetobacter baumannii* с кислородной маски больного, а также в мазках из ротоглотки этого больного. ПБА комплекса *Acinetobacter baumannii* также выделены в ЛПУ № 2 — в 4 из 15 положительных проб, но штаммы, за исключением одного из них, в основном без дополнительных лекарственноустойчивых детерминант;

2. выделение в смывах РАО ЛПУ № 1 еще одного агрессивного патогена из группы неферментирующих грамотрицательных бактерий — штамма *Pseudomonas aeruginosa*, карбапенемрезистентного варианта, — с кислородной маски другого пациента;

3. обнаружение выраженной закономерности более частой регистрации бактериальных патогенов в воздухе в ЛПУ № 1 — 11,6% [3,9–22,7] — в сравнении с ЛПУ № 2 — 2,1% [0,3–2,2]; $p_{\text{Fisher exact}} = 0,097$, даже несмотря на отсутствие статистически значимых отличий между частотой выявления ПБА в воздухе наблюдаемых ЛПУ. Более того, именно в ЛПУ № 1 в воздушной среде выявлены лекарственно-устойчивые варианты *S. haemolyticus* и *S. aureus*.

Следует обратить внимание, что в обоих учреждениях в смывах выделены ПБА рода *Pantoea* (в 5 из 20 изолятов ПБА). Из последних научных публикаций известно, что штаммы рода *Pantoea* spp. отмечены как возбудители госпитальных инфекций, способные колонизировать различные устройства медицинского назначения, а также отличающиеся способностью к биопленкообразованию и поражению больных с нарушением иммунного статуса [10].

Следует отметить, что бактерии рода *Pantoea*, являющиеся индикаторными признаками рис-

ка развития ИСМП, выделены как из внешней среды, так и от больных, что свидетельствует о циркуляции в больничной среде этого патогена и необходимости усиления мер противодействия развитию ИСМП [10].

Перечень возбудителей, выявляемых от больных, значительно шире, чем из внешней среды ($\chi^2 = 7,0$; $p = 0,009$), что может свидетельствовать о частичной эффективности системы дезинфекционных мероприятий, развернутых в ЛПУ № 1 и ЛПУ № 2. При этом спектр возбудителей оказался более разнообразным в смывах окружающей среды, нежели в пробах воздуха ($\chi^2 = 4,4$; $p = 0,04$). Однако выделение основных агрессивных патогенов из внешней среды в период внезапных выходов на забор материала все же указывает на недостаточность дезинфекционных мероприятий, проводимых в обоих ЛПУ.

Следовательно, выполненное санитарно-бактериологическое обследование ЛПУ в полной мере не отражает истинного положения дел. Тем не менее из представленных материалов очевидно, что необходимо усиление мер по поддержанию санитарно-эпидемиологического режима в ЛПУ, которые были проанализированы в данном исследовании.

Заключение

Установленная нами циркуляция большого перечня микроорганизмов во внешней среде двух стационаров, в которой патогены могут длительно сохраняться, накапливаться, обеспечивает высокий риск заражения пациентов из больничной среды и участие в развитии эпидемического процесса бактериальных инфекций [6].

При сравнительном анализе бактериальной флоры внешней среды двух лечебных учреждений было показано, что риск инфицирования более вероятен в ЛПУ № 1, так как флора с высоким патогенным потенциалом была выделена в РАО (комплекс *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*, устойчивые к цефалоспорином III–IV поколения и к карбапенемам). Постоянный мониторинг ситуации необходим в каждом конкретном стационаре.

Список литературы/References

1. Акимкин В.Г. Группы внутрибольничных инфекций и системный подход к их профилактике в многопрофильном стационаре // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2003. Т. 5. С. 15–19. [Akimkin V.G. Groups of nosocomial infections and a systemic approach to their prevention at multidisciplinary hospital. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2003, vol. 5, pp. 15–19. (In Russ.)]
2. Акимкин В.Г., Тутельян А.В., Брусина Е.Б. Актуальные направления научных исследований в области неспецифической профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014. Т. 2. С. 40–44. [Akimkin V.G., Tutelian A.V., Brusina E.B. Topical areas of researches in the nonspecific prevention of health care-associated infections. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktualnye voprosi = Epidemiology and Infectious Diseases. Current items*, 2014, vol. 2, pp. 40–44. (In Russ.)]
3. Бондаренко А.П., Шмыленко В.А., Троценко О.Е., Зайцева Т.А. Некоторые аспекты развития эпидемического процесса инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (обзор литературы) // Дальневосточный журнал ин-

- фекционной патологии. 2019. № 36. С. 92–97. [Bondarenko A.P., Shmylenko V.A., Trotsenko O.E., Zaitseva T.A. Some aspects of epidemic process of health care-associated infections: a review. *Dal'nevostochnyj zhurnal infektsionnoy patologii = Far Eastern Journal of Infectious Pathology*, 2019, no. 36, pp. 92–97. (In Russ.)]
4. Брусина Е.Б., Рычагов И.П. Эпидемиология внутрибольничных гнойно-септических инфекций в хирургии. Новосибирск: Наука, 2006. 171 с. [Brusina E.B., Rychagov I.P. Epidemiology of healthcare associated purulent-septic infections in surgery. *Novosibirsk: Nauka*, 2006. 171 p. (In Russ.)]
 5. Головерова Ю.А., Марьин Г.Г., Шабалина С.В., Тутельян А.В., Орлова О.А., Акимкин В.Г. Уровень заболеваемости инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, в отделениях высокого эпидемиологического риска инфицирования // Инфекционные болезни. 2019. Т. 17, № 3. С. 69–73. [Goloverova Yu.A., Mariin G.G., Shabalina S.V., Tutelian A.V., Orlova O.A., Akimkin V.G. Incidence of health care-associated infections in high-risk hospital units. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2019, vol. 17, no. 3, pp. 69–73. (In Russ.)]
 6. Гончаров А.Е., Зуева Л.П., Мохов А.С., Колоджиева В.В., Мельцер А.А., Смирнова М.В., Хавлина Т.В., Оришак Е.А. Распространение мультиантибиотикорезистентных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в стационарах для лечения пациентов с COVID-19 // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2021. Т. 20, № 2. С. 68–73. [Goncharov A.E., Zueva L.P., Mokhov A.S., Kolodzhieva V.V., Meltser A.A., Smirnova M.V., Khavlina T.V., Orishak E.A. Spread of multi-antibiotic-resistant health-care pathogens in hospitals to treat COVID-19 patients. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2021, vol. 20, no. 2, pp. 68–73. (In Russ.)]
 7. Коза Н.М. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи. Эпидемиология и профилактика: обзорная лекция // Пермский медицинский журнал. 2013. Т. 30, № 4. С. 135–143. [Koza N.M. Infections connected with rendering medical care. *Epidemiology and prevention (review lecture)*. *Permskiy meditsinskiy zhurnal = Perm Medical Journal*, vol. 30, no. 4, pp. 135–143. (In Russ.)] doi: 10.17816/pmj304135-143
 8. Омарова С.М., Муталипова З.М.-К., Нурмагомедова З.М., Меджидова Д.Ш., Юнусова Р.Ю., Горелова В.Г. Видовой состав и биологические свойства возбудителей нозокомиальных пневмоний, выделенных в стационарах хирургического профиля Махачкалы // Клиническая лабораторная диагностика. 2012. Т. 12. С. 38–40. [Omarova S.M., Mutalipova Z.M.-K., Nurmagomedova Z.M., Medzhidova D.Sh., Yunusova R.Yu., Gorelova V.G. The specific compound and biological characteristics of agents of nosocomial pneumonia isolated in hospital surgery departments of Makhachkala. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2012, no. 12, pp. 38–40. (In Russ.)]
 9. Орлова О.А., Акимкин В.Г. Организация эпидемиологической диагностики вентилятор-ассоциированных инфекций дыхательных путей // Медицинский алфавит. 2017. Т. 3, № 30. С. 15–19. [Orlova O.A., Akimkin V.G. Organization of epidemiological diagnosis of ventilator-associated respiratory infections. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet*, 2017, vol. 3, no. 30, pp. 15–19. (In Russ.)]
 10. Mani S., Nair J. Pantoea infections in the neonatal intensive care unit. *Cureus*, 2021, vol. 13, no. 2: e13103. doi: 10.7759/cureus.13103

Авторы:

Троценко О.Е., д.м.н., директор ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;
Бондаренко А.П., к.м.н., зав. лабораторией бактериологии ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;
Пшеничная Н.Ю., д.м.н., профессор, зам. директора по клинико-аналитической работе ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Зайцева Т.А., руководитель Управления Роспотребнадзора по Хабаровскому краю, г. Хабаровск, Россия;
Гарбуз Ю.А., главный врач ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае, Россия;
Чишагорова И.В., зав. бактериологической лабораторией ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае, Россия;
Шмыленко В.А., научный сотрудник лаборатории бактериологии ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;
Базыкина Е.А., научный сотрудник ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;
Огиенко О.Н., младший научный сотрудник лаборатории бактериологии ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия.

Authors:

Trotsenko O.E., PhD, MD (Medicine), Director of Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rosпотребнадзор, Khabarovsk, Russian Federation;
Bondarenko A.P., PhD (Medicine), Head of the Bacteriological Laboratory, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rosпотребнадзор, Khabarovsk, Russian Federation;
Pshenichnaya N.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Clinical Analytical Studies, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rosпотребнадзор, Khabarovsk, Russian Federation;
Zaitseva T.A., Head of Khabarovsk Krai Rosпотребнадзор Regional Office, Khabarovsk, Khabarovsk, Russian Federation;
Garbuz Yu.A., Head Doctor, Center of Hygiene and Epidemiology of Khabarovsk Krai, Khabarovsk, Russian Federation;
Chishagorova I.V., Head of the Bacteriological Laboratory, Center of Hygiene and Epidemiology of Khabarovsk Krai, Khabarovsk, Russian Federation;
Shmylenko V.A., Researcher, Bacteriological Laboratory, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rosпотребнадзор, Khabarovsk, Russian Federation;
Bazykina E.A., Researcher, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rosпотребнадзор, Khabarovsk, Russian Federation;
Ogienko O.N., Junior Researcher, Bacteriological Laboratory, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rosпотребнадзор, Khabarovsk, Russian Federation.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА МАННОЗОСВЯЗЫВАЮЩЕЙ ЛЕКТИН- АССОЦИИРОВАННОЙ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕАЗЫ (MASP2) У КОРЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РОССИЙСКИХ АРКТИЧЕСКИХ ТЕРРИТОРИЙ

М.В. Смольникова, М.А. Малинчик, С.Ю. Терещенко

*НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр
Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия*

Резюме. Маннозосвязывающие лектин-ассоциированные сериновые протеазы (MASP) являются одними из ключевых участников лектинового пути (lectin pathway, LP) активации комплемента. MASP-2 наиболее изучена среди ферментов, способных активировать как маннозосвязывающий лектин (mannose-binding lectin, MBL), так и фиколины — паттерн-распознающие острофазовые белки, участвующие в элиминации патогенных микроорганизмов посредством LP активации комплемента. Ген *MASP2* имеет ряд мутаций, наиболее значимой является мутация rs72550870 (p.D120G), в гомозиготном состоянии (GG) она ассоциирована с врожденным дефицитом MASP-2 и характеризуется полным отсутствием сывороточной активности протеазы, приводя к нарушению связывания с лектинами. Это способствует тяжелому течению инфекционных заболеваний с высоким риском неблагоприятного исхода. Частота генотипов и гаплотипов полиморфизмов в гене *MASP2* имеет значительные популяционные различия. К настоящему времени данные относительно распределения генотипов гена *MASP2* в коренных популяциях российских арктических регионов отсутствуют. Целью исследования стало изучение частоты и этнической специфики распределения аллельных вариантов полиморфизма гена *MASP2* rs72550870 в популяциях Таймырского Долгано-Ненецкого округа Красноярского края (ненцы, долганы, нганасаны) и города Красноярска (русские). Генотипирование *MASP2* осуществлено при помощи метода ПЦР в режиме реального времени. Частота встречаемости генотипа AG, ассоциированного с низкой концентрацией MASP-2, составила 6,6% для русских новорожденных Восточной Сибири. У новорожденных арктических популяций частота генотипа AG была статистически значимо ниже, чем у русских, и составила 0,3% для ненцев и 0,9% для долган-нганасан, что приближается к значениям частот, выявленных для азиатских и африканских популяций (0%). Не было обнаружено ни одного гомозиготного генотипа GG, ассоциированного с врожденным дефицитом MASP-2, в образцах ДНК от новорожденных коренных популяций Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края (ненцев и долган-нганасан) и европеоидов г. Красноярска. Частота аллельного варианта G rs72550870 у русских составила 3,3%, что приближено к частотам в европейских

Адрес для переписки:

Смольникова Марина Викторовна
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г,
НИИ медицинских проблем Севера — обособленное
подразделение ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр
Сибирского отделения РАН.
Тел.: 8 391 228-06-81.
E-mail: smarinv@yandex.ru

Contacts:

Marina V. Smolnikova
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizana
Zheleznyaka str., 3g, Research Institute of Medical Problems
of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch,
Russian Academy of Sciences.
Phone: +7 391 228-06-81.
E-mail: smarinv@yandex.ru

Для цитирования:

Смольникова М.В., Малинчик М.А., Терещенко С.Ю. Полиморфизм гена маннозосвязывающей лектин-ассоциированной сериновой протеазы (MASP2) у коренных популяций российских арктических территорий // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 543–550. doi: 10.15789/2220-7619-GPO-1712

Citation:

Smolnikova M.V., Malinchik M.A., Tereschenko S.Yu. Gene polymorphism of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP2) in indigenous populations of the Russian arctic territories // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 543–550. doi: 10.15789/2220-7619-GPO-1712

Работа выполнена при финансовой поддержке Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности (грант № 2020090306591).

This work was supported financially by the Krasnoyarsk Regional Fund for Support of Scientific and Scientific-Technical Activity (grant No. 2020090306591).

популяциях мира (4,0%), тогда как у коренных жителей Арктического региона составила 0,5%. Мы предполагаем, что изолированные арктические популяции исторически позже столкнулись с некоторыми внутриклеточными инфекциями и, в отличие от европеоидных популяций, сохранили сформированную на ранних этапах эволюции человека высокую активность лектинового пути активации комплемента.

Ключевые слова: *MASP2*, полиморфизм, новорожденные, Россия, арктические популяции, лектиновый путь.

GENE POLYMORPHISM OF MANNOSE-BINDING LECTIN-ASSOCIATED SERINE PROTEASE (MASP2) IN INDIGENOUS POPULATIONS OF THE RUSSIAN ARCTIC TERRITORIES

Smolnikova M.V., Malinchik M.A., Tereschenko S.Yu.

Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASP) are among of the key components in the lectin pathway (LP) of the complement activation. MASP-2 is the most studied agent among specific enzymes activating both mannose-binding lectin (MBL) and ficolins, pattern-recognition proteins involved in the elimination of pathogenic microorganisms through LP complement activation. There are some mutations in *MASP2*, with the most significant identified as rs72550870 (p.D120G). The homozygous GG rs72550870 is associated with congenital MASP-2 deficiency and characterized by a total lack of serum protease activity, which leads to impaired binding to lectins. This, in turn, results in severe course of infectious diseases with a high risk of adverse outcome. There seem to be some marked populational differences in the genotype and haplotype prevalence in *MASP2* gene polymorphisms. To date, no data are available on the genotype distribution for the *MASP2* gene in the indigenous populations of the Russian Arctic regions. The aim of the work was to study the prevalence and ethnic specificity in the distribution of allelic variants of *MASP2* rs72550870 in the populations of the Taymyr Dolgan-Nenets District of the Krasnoyarsk Territory (Nenets, Dolgans, Nganasans) as well as the city of Krasnoyarsk (Russians). *MASP2* genotyping was performed by using real-time PCR. The frequencies of the AG genotype associated with low MASP-2 level was 6.6% for ethnic Russian newborns in the Eastern Siberia. The prevalence of the AG genotype was significantly lower in newborns of the Arctic populations than in the Russians, being 0.3% and 0.9% for the Nenets and the Dolgan-Nganasans, respectively, which is close to the prevalence values identified for Asian and African populations (0%). No homozygous GG rs72550870 associated with congenital MASP-2 deficiency in newborns of the indigenous populations of the Taymyr Dolgan-Nenets region of Krasnoyarsk Territory (Nenets and Dolgan-Nganasans) and ethnic Caucasian subjects of the Krasnoyarsk city was detected. The frequency of the rare allelic variant G rs72550870 in ethnic Russian subjects was 3.3%, being close to the frequencies in the European populations of the world (4.0%), whereas it was 0.5% in the indigenous inhabitants of the Arctic Region. We have suggested that isolated Arctic populations encounter some intracellular infections historically later and, as contrasted with Caucasoid populations, retained a high activity in the lectin pathway of the complement activation established at the early stage of human evolution.

Key words: *MASP2*, polymorphism, newborns, Russia, arctic populations, lectin pathway.

Введение

Врожденные дефекты системы комплемента в патогенезе различных заболеваний от инфекционных до аутоиммунных и кардиометаболических составляют не менее 5% общего числа первичных иммунодефицитов, а многие аспекты их распространенности и патогенеза остаются неизученными [7]. Система комплемента является древнейшим компонентом врожденного иммунитета, основной функцией которого является ликвидация инфекционных агентов и собственных клеток организма человека. Кроме того, протеины комплемента создают связь между системами врожденного и адаптивного иммунитета, обеспечивая нормальные условия для созревания и дифференциации В- и Т-лимфоцитов. Плазменные протеины взаимодействуют между собой тремя известными путями: лектиновым (наиболее филогенетически древним), альтернативным и классическим.

Лектины — общий термин протеинов, формирующих отдельное суперсемейство рецепто-

ров [3], способных к распознаванию и агрегации молекул олиго- и полисахаридной природы. Среди всех лектинов уникальными функциями формирования комплексов с углеводными компонентами микробной стенки обладают фиколины и коллектины — маннозосвязывающий лектин (mannose-binding lectin, MBL), печеночный и почечный коллектины [26]. Образование сложного комплекса: полисахариды микробной стенки + коллектин/фиколин + специфические протеазы (Mannose-binding lectin-Associated Serine Protease: MASP-1, MASP-2 и MASP-3) приводит к активации лектинового пути системы комплемента, воспалительной реакции и элиминации бактерии. Дефицит или дефект какого-либо из звеньев такого комплекса приводит к нарушению защитных функций иммунитета, повышается подверженность заболеваниям.

На иммунологическую функцию лектинов влияют мутации в промоторном регионе и в кодирующей части их генов, модулируя транскрипционную активность и изменяя концентрацию белка. Так, доминантные мутации в 1 экзоне

гена *MBL*, расположенного на 10 хромосоме (10q11.2-q21), приводят к снижению способности *MBL* к олигомеризации и, соответственно, к снижению его концентрации в плазме и функциональной активности. Для оценки клинических последствий генетически детерминированных различий в экспрессии *MBL* было предложено выделять *MBL*-дефицитные, *MBL*-промежуточные и высоко экспрессирующие *MBL* диплотипы [12]. В целом считается, что 20–25% всей человеческой популяции являются носителями *MBL*-дефицитных гаплотипов, а у 8–10% *MBL* в плазме крови отсутствует или крайне низок [9]. Большинство *MBL*-дефицитных индивидов являются в целом здоровыми. В то же время значительное количество исследований показывает, что генетически детерминированный уровень *MBL* может модифицировать риск возникновения и клинические характеристики многих инфекционных заболеваний, а недостаточность *MBL* считается наиболее частым иммунодефицитом человека, имеющим множество клинических ассоциаций [25]. Причем, такое влияние имеет разнонаправленный характер. Многочисленные исследования связывают дефицит *MBL* с повышенной восприимчивостью к ряду инфекционных и аутоиммунных заболеваний [5, 6]. Высокий уровень *MBL* является защитным фактором в отношении возникновения и тяжести инфекций, вызванных инкапсулированными бактериями, прежде всего у детей раннего возраста [2]. Тем не менее была высказана гипотеза, что нормальные/высокие уровни *MBL* могут повышать риск инфицирования и воспалительной реакции при инфекциях, вызванных некоторыми внутриклеточными возбудителями (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* и др.) [10]. Следовательно, носители некоторых *MBL*-дефицитных гаплотипов могут иметь определенное клиническое преимущество при этих внутриклеточных инфекциях.

Фиколины — лектин-распознающие молекулы, структурно и функционально гомологичные *MBL*. Описано три вида фиколинов: М-фиколин, кодирующийся геном *FCN1*, L-фиколин (*FCN2*) и Н-фиколин (*FCN3*). Структура фиколинов очень похожа на структуру *MBL* и также имеет домен, авидный к тем же углеводным компонентам бактерий, что и *MBL*. Описаны полиморфизмы промоторных и структурных регионов генов фиколинов, ответственные за многократные различия в концентрации белка, а полное отсутствие фиколинов (нулевые плазменные уровни), в отличие от *MBL*, к настоящему времени не зафиксировано. Опубликованные результаты исследований связи концентрации и полиморфизмов генов фиколинов с какими-либо заболеваниями немногочисленны. Польские исследователи показали, что у детей с атопией с частыми рес-

пираторными инфекциями выявляются более низкие концентрации L-фиколина в плазме крови [8]. А. Mishra и соавт. [18] показали, что высокие плазменные уровни L-фиколина обусловлены его низкой функциональной способностью связывать бактерию и, соответственно, меньшей способностью накапливаться в очаге воспаления. Наиболее изучен ген *FCN2*, расположенный в хромосомной области 9q34.3. Была обнаружена связь между полиморфизмом *FCN2*, повышенными уровнями L-фиколина в плазме и восприимчивостью к висцеральному лейшманиозу, шистосомозу, гепатиту В и туберкулезу [18].

Помимо *MBL* и фиколинов, одним из ключевых участников лектинового пути активации комплемента является семейство маннозсвязывающих лектин-ассоциированных сериновых протеаз (*MASP*). В семействе *MASP* были идентифицированы три протеазы (*MASP-1*, *MASP-2*, *MASP-3*) и два родственных неферментативных белка, *MAp19* (*sMAP*) и *MAp44* (*MAP1*). Наиболее изученной среди специфических ферментов, способных активировать как *MBL*, так и фиколины, является протеаза 2 типа — *MASP-2*. В результате анализа уровня *MASP-2* в плазме у людей из различных этнических групп показано, что самым низким уровнем был у африканцев, за которыми следовали китайцы из Гонконга, индейцы и датчане европеоидной расы [25]. Полиморфный ген *MASP2* расположен на хромосоме 1p36.23-31, имеет 12 экзонов и кодирует два белка, *MASP-2* и *MAp19*. Наиболее значимой мутацией *MASP2* является rs72550870 (p.D120G), она приводит к замене аспарагиновой кислоты на глицин, вследствие чего белок теряет способность активировать комплемент из-за невозможности образовывать комплексы с лектинами, в частности с *MBL*. Врожденный дефицит *MASP-2* обусловлен мутацией rs72550870 в гомозиготном состоянии (*GG*), характеризуется полным отсутствием сывороточной активности протеазы и приводит к нарушению связывания с *MBL* и с фиколинами [22, 24]. Всего тринадцать случаев гомозиготного носительства *GG* rs72550870 было описано в литературе с момента выявления первого случая, зарегистрированного в 2003 г. [22].

Клинические проявления снижения/отсутствия активности *MASP-2* могут варьировать от полного здоровья до тяжелых инфекций и предрасположенности к онкологическим заболеваниям [5]. После того как появились данные о трех здоровых взрослых с дефицитом *MASP-2*, гомозиготных по *GG* в *MASP2* [11, 20], клиническая пенетрантность этого дефицита стала сомнительной. Вероятно, что в LP участвуют неидентифицированные молекулы и функции, которые могут объяснить, почему дефицит *MASP-2* относительно часто встречается у практически здоровых людей [5]. Было высказано предполо-

жение, что лектиновый путь активации системы комплемента необязателен или даже избыточен (например, при тяжелом течении COVID) для формирования иммунного ответа у большинства здоровых лиц, а его дефицит клинически значим только в определенных ситуациях, например у недоношенных новорожденных.

Таким образом, ассоциация дефицита MASP-2 (GG rs72550870) с клиническими проявлениями в настоящее время является неопределенной.

Этнические особенности частот распределения полиморфизмов генов компонентов лектинового пути активации комплемента. Распределение частот гаплотипов гена *MBL* имеет крайне выраженные популяционные различия. Так, частота встречаемости гаплотипа *HYPА*, ассоциированного с высокой концентрацией *MBL*, варьирует от 6–8% в африканских популяциях (Мозамбик, Кения), до 64–81% в северных коренных популяциях (североамериканские индейцы, инуиты). Европеоиды занимают промежуточное положение с 27–30% частотой гаплотипа *HYPА* [4, 13, 16].

Минорный аллель *FCN2* rs17549193 (+6359С>Т) связан со значительным снижением связывающей способности L-фиколина с углеводными компонентами клеточных стенок бактерий, в то время как минорный аллель rs7851696 (+6424G>Т) связан с повышенной связывающей способностью [14]. Кроме того, было показано, что у здоровых голландских доноров уровни L-фиколина в плазме прогрессивно снижались в зависимости от наличия мутантного аллеля rs7851696. Это свидетельствует о том, что данный вариантный аллель связан с высокой тканевой активностью L-фиколина и одновременно с его низкой концентрацией в плазме. Не было обнаружено статистически значимой связи между концентрацией L-фиколина в сыворотке и полиморфизмом rs17549193 в этой голландской когорте [19]. В то же время некоторые исследования показали, что высокие уровни L-фиколина были связаны с вариантным аллелем rs17549193 [8].

Данные о популяционных частотах полиморфизмов гена *MASP2* стали появляться в литературе относительно недавно. Так, в датской когорте частота редкого аллеля G* rs72550870 составила 3,9%, такая же частота выявлена в исландской выборке взрослых доноров. Интересно, что аллель G вообще не был выявлен в популяциях китайцев Гонконга, африканских замбийцев и коренных американцев Бразилии [25].

Данные о частотах распределения полиморфизмов генов *MBL2*, *FCN2*, *FCN3* и *MASP2* в российских популяциях и патогенетической роли компонентов лектинового пути компонента крайне немногочисленны. А.О. Романов и соавт. [1] изучили распространенность одного полиморфизма +230G/A гена *MBL* у жителей Санкт-Петербурга: гомозиготы по мутантному аллелю А составили 30 (25%) и 5 (4%) соответственно.

Авторы делают вывод что, «учитывая частую встречаемость мутации гена *MBL*, являющейся причиной первичного иммунодефицита, в популяции Санкт-Петербурга, необходим скрининг пациентов с рецидивирующими инфекциями». Ряд исследований российских авторов был посвящен клинико-генетическим сопоставлениям мутаций в гене *MBL* с риском сердечно-сосудистых заболеваний, преэклампсии, особенностями клинической картины муковисцидоза и прогрессирования ВИЧ-инфекции.

Результаты наших более ранних исследований [23] показывают, что частота высокопродуктивного гаплотипа *HYPА* гена *MBL2* составляет 35,4% у русских новорожденных Восточной Сибири, что соответствует частотам в Европейских популяциях (голландцы — 27%, датчане — 30%, чехи — 33%), а также у европеоидов Бразилии (28–34%). В то же время у новорожденных Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края частота гаплотипа *HYPА* была статистически значимо выше, чем у русских, и составила 64% для ненцев и 56% для долган-нганасан, что близко к значениям частот распространения выявленных для эскимосов (81%) и североамериканских индейцев (64%). Кроме того, в аборигенных популяциях как ненцев, так и долган-нганасан по сравнению с русским населением мы обнаружили снижение распространенности генотипа полиморфизма *FCN2* rs7851696, связанного с низким сродством L-фиколина к углеводам. Результаты нашего исследования [21] показали, что ненецкая популяция обладает рядом важных особенностей по сравнению с долганями-нганасанами: более низкой распространенностью аллеля Т для полиморфизма rs17549193 и более высокой распространенностью аллеля Т для полиморфизма rs7851696 *FCN2*. Мы полагаем, что этот генотип является генетическим маркером высокой функциональной способности L-фиколина в ненецкой популяции.

Согласно анализу доступных нам литературных данных, в настоящее время популяционные частоты мутаций, ассоциированных с врожденным дефицитом MASP-2 (rs72550870), в российских популяциях и в популяциях коренных народностей российских арктических территорий не изучены. Актуальность получения таких данных для российских арктических популяций значительно возрастает, учитывая накапливающиеся доказательства важной роли лектинового пути активации комплемента в отношении вирусных инфекций. Так, например, предполагается важная роль *MBL* в отношении респираторных вирусных инфекций, в том числе инфекции, вызываемой новым коронавирусом SARS-CoV-2 — COVID-19 [15, 17]. Роль врожденных дефицитов протеинов LP, в том числе MASP-2, в таких клинических ситуациях совершенно не из-

учена. Принимая во внимание то, что инфекции являются основными факторами детской смертности, а лектины являются решающими факторами противoinфекционной защиты, вероятно, что дефицит лектинов будет способствовать увеличению смертности.

Целью данной работы было выявить популяционно-этнические различия распределения аллельных вариантов гена маннозосвязывающей лектин-ассоциированной сериновой протеазы (*MASP2*) у коренных популяций Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края (ненцев и долган-нганасан) по сравнению с европеоидами города Красноярска.

Материалы и методы

Для изучения однонуклеотидного полиморфизма *MASP2* rs72550870 использованы 920 образцов высохших пятен крови от новорожденных из Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края и города Красноярска, полученные ранее в Красноярском краевом консультативно-диагностическом центре медицинской генетики.

Демографические характеристики обследованных новорожденных по региону проживания матери опубликованы в нашем раннем исследовании [21]. Новорожденные были разделены на четыре группы для изучения этнической специфики полиморфизма *MASP2*: 1) 323 из деревень с преимущественно ненецким населением (ненцы составляют 85% населения); 2) 112 из деревень с преимущественно долган-нганасанским населением (долган-нганасаны составляют 91% населения); 3) 243 из деревень со смешанным населением с различной комбинацией коренных и смешанных популяций; 4) 242 новорожденных из города Красноярска, у которых были европейские корни (русские).

Исследование было одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера (№ 9 от 08.09.2014). Получено письменное информированное согласие на проведение исследования от всех участников.

Материалом исследования послужила ДНК, выделенная из сухих пятен крови с использованием набора DIAtom DNAprep100 (ООО «Изоген», Россия). Генотипирование rs72550870 было осуществлено при помощи метода ПЦР в режиме реального времени с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченных зондов (TagMan) (ООО «ДНК-синтез», Россия) по протоколу производителя. Нуклеотидная последовательность аллель-специфической пробы для генотипирования: rs72550870-F = GCAAGGACACTTTCTACTCGC, rs72550870-R = TCACCCTCGGCTGCATAG, флюорофор FAM соответствовал аллельному варианту А, а VIC — аллельному варианту G.

Соответствие частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга было проверено с использованием χ^2 . Статистически значимые различия были приняты при $p < 0,05$ после коррекции для множественного тестирования.

Результаты и обсуждение

Преимуществом нашего подхода к популяционной оценке распространенности иммунодефицитных генотипов является исследование новорожденных, когда еще не произошло исключение неблагоприятных генетических вариаций, возможное в старшем возрасте в результате клинической реализации генетической предрасположенности.

Частоты генотипов и вариантного аллеля *MASP2* rs72550870 представлены в таблице. Анализ распространенности генотипов *MASP2* показал преобладание гомозиготного варианта AA во всех исследованных в работе популяциях, что совпадает с доступными мировыми данными. Гетерозиготный генотип AG rs72550570 встречается в единичных случаях у ненцев и долган-нганасан по сравнению с новорожденными европеоидного происхождения из г. Красноярска. Частота генотипа AG у русских (6,6%) статистически значимо выше, чем у арктических популяций (ненцы: 0,3%, $p < 0,001$; долганы-нганасаны: 0,9%, $p = 0,02$; смешанные: 2,1%, $p = 0,02$). Таким образом, гетерозиготный вариант AG присутствует у 16 из 242 русских новорожденных, тогда как из 23 ненцев только у одного. Ни в одной из популяционных групп не было обнаружено гомозигот по минорному аллелю G*, ассоциированному с отсутствием сывороточной активности протеазы.

Аллельный вариант G* *MASP2* rs72550870 имеет нулевые или крайне низкие частоты в популяциях мира. Согласно источнику ensemble.org, частота в европеоидных популяциях составляет 4,0%, в американской популяции — 2,0%, а среди азиатских и африканских популяций она нулевая.

В результате нашего исследования получены данные о распространенности мутантного аллеля G* rs72550870 в Российских арктических популяциях: 0,5% среди новорожденных Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края ($n = 678$) и 3,3% среди русских города Красноярска ($n = 242$).

В двух наиболее информативных исследованиях, проведенных группой S. Triel в 2007 и 2009 гг., получены данные о девяти мутациях в гене *MASP2*, частота встречаемости мутантных аллельных вариантов почти во всех крайне низкая. Только в результате мутации rs72550870 происходят изменения структуры белка MASP-2, что ведет к нарушению его связывания в комплекс с MBL и, как результат, неспособности активировать систему комплемента. Кроме этого,

авторы отмечают, что именно у европеоидов вариантный аллель G rs72550870 является основной причиной более низких уровней MASP-2 [25]. По результату популяционного анализа сообщается об отсутствии гомозиготного генотипа GG rs72550870 среди взрослых китайцев, африканцев, европеоидов, инуитов Гренландии и бразильцев [25]. Гетерозиготный вариант преобладал у европеоидов из Дании (3,9%) и инуитов Западной Гренландии (где высока примесь европеоидной популяции, как сообщают авторы) (3,7%), но не встречался в других исследованных популяциях ($p < 0,0001$). Также авторы приводят частоты редкого аллельного варианта, полученные другими исследователями в разных популяциях у здоровых лиц и пациентов с различными заболеваниями. Так, в шведской популяции обнаружено 14 гетерозигот у 112 пациентов с муковисцидозом (частота 6,3%) и пять гетерозигот у 200 здоровых людей (частота 1,3%). В исследовании пациентов с псориазом и членов их семей 894 человека были протестированы на MASP2 rs72550870, и в общей сложности было обнаружено 62 гетерозиготы и одна гомозигота, что дало частоту гена 3,6% (аллель не был связан с псориазом). Гомозиготность была зарегистрирована у одного человека в группе из 293 польских детей с респираторными инфекциями и у одного ребенка с муковисцидозом. Новое исследование испанской популяции выявило двух гомозиготных из 2008 человек (включая 967 пациентов с пневмонией, 130 пациентов с СКВ, 43 ребенка с рецидивирующими респираторными инфекциями и 868 здоровых людей), но ассоциации заболеваний с вариантным аллелем не было выявлено. Отсутствие аллеля G MASP2 rs72550870 в Китае подтверждается отчетом, в котором исследуется

влияние генотипов MBL2 и MASP2 на предрасположенность к тяжелому острому респираторному синдрому (SARS). У всех 1757 протестированных азиатов аллель G обнаружен не был. Таким образом, следует сделать вывод, что в случае MBL, а также других компонентов комплекта (в том числе MASP2), дефицит сам по себе не приводит к заболеванию или восприимчивости к инфекциям, а, скорее, является модификатором, который может проявляться клинически, когда также нарушаются другие элементы.

Кроме этого, распределение частот мутаций, ассоциированных с концентрацией протеазы MASP-2, в разных популяциях отличается. Отмеченное выше географическое распространение rs72550870 MASP2 в соответствии с данными ресурса ensemble.org и данными исследований ряда авторов может отражать результат эволюционной адаптации к разным условиям проживания либо, как мы полагаем, результат «эффекта основателя». Иными словами, указанная мутация может быть исторически молодой и частота ее распределения между континентами и изолированными народностями связана с популяционно-генетическими процессами, не включающими естественный отбор.

Как указывалось выше, в настоящее время популяционные частоты мутаций, ассоциированных с врожденным дефицитом MASP-2 (rs72550870) в российских популяциях в целом и в популяциях коренных народностей российских арктических территорий в частности, не изучены. В нашем исследовании были впервые получены данные о частотах генотипов rs72550870 MASP2 среди коренных народностей российских арктических территорий. При этом ранее нами было показано, что популяции коренных наро-

Таблица. Частоты генотипов MASP2 у новорожденных различных этнических популяций Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края и города Красноярска, n (%)

Table. MASP2 genotype frequencies among newborns from different ethnic populations of the Taymyr Dolgan-Nenets Region in the Krasnoyarsk Krai and the city of Krasnoyarsk, n (%)

Генотип MASP2 Genotype MASP2 (rs72550870)	Ненцы Nenets (n = 323)	Долганы-нганасане Dolgans-Nnganasans (n = 112)	Смешанная популяция Mixed Arctic populations (n = 243)	Русские Russians (n = 242)	p
AA	322 (99,7)	111 (99,1)	238 (97,9)	226 (93,4)	1-3 = 0,05 1-4 < 0,001 2-4 = 0,02 3-4 = 0,01
AG	1 (0,3)	1 (0,9)	5 (2,1)	16 (6,6)	1-3 = 0,05 1-4 < 0,001 2-4 = 0,02 3-4 = 0,01
GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-
G*	1 (0,2)	1 (0,4)	5 (1,0)	16 (3,3)	1-3 = 0,05 1-4 < 0,001 2-4 = 0,02 3-4 = 0,01

Примечание. Указаны только значения $p \leq 0,05$.
Note. Values with significant $p \leq 0.05$ are shown only.

дов Арктики генетически характеризуются большей активностью как минимум двух различающихся компонентов лектинового пути активации комплемента — MBL и L-фииколина [21, 23].

В основе гипотезы, объясняющей результаты настоящего и предыдущих наших исследований [21, 23], лежит предположение о том, что эволюция человека продвигалась в направлении накопления генотипов с низкой активностью лектинового пути активации комплемента вследствие широкого распространения некоторых внутриклеточных инфекций, таких как туберкулез и лепра, при которых низкая активность отдельных компонентов каскадного пути может оказывать защитный эффект. Мы предполагаем, что изолированные арктические популяции Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края исторически позже столкнулись с этими инфекциями и, таким образом, сохранили сформированную на ранних этапах эволюции человека высокую активность лектинового пути активации комплемента. В соответствии с указанной гипотезой мы выявили более низкие показатели распространенности генетических маркеров MASP-2 дефицитов в популяциях коренных жителей арктических территорий Красноярского края по сравнению с европеоидами г. Красноярска.

Исследование этнически-ассоциированного уровня неспецифической противоиной защиты среди коренного населения Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края можно будет использовать для формирования планов органов практического здравоохранения в отношении профилактики инфекционной заболеваемости и в целях наиболее рационального привлечения трудовых ресурсов для работ в условиях возможной высокой инфекционной нагрузки. Дополнительный анализ инфекционной заболеваемости в арктических популяциях, которые мы планируем изучать далее, позволит выявить фенотипические характеристики, сопряженные с высокой функциональной активностью лектинового пути активации комплемента в роли важнейшего фактора первой линии противоиной защиты, в том числе и в отношении новых вирусных заболеваний, таких как COVID-19. Такие клинко-генетические сопоставления чрезвычайно важны для выяснения физиологической роли MBL2, фииколинов и MASP-2, а выявленные нами генетические особенности этнически изолированных коренных арктических популяций Красноярского края предоставляют уникальный шанс для проведения такого исследования.

Список литературы/References

1. Романов А., Беляева Т., Красильщикова И. Частота встречаемости полиморфизма+ 230G/A гена MBL у жителей Санкт-Петербурга // Medline.ru. 2006. Т. 7, № 1. С. 372–377. [Romanov A., Belyaeva T., Krasil'shchikova I. Frequency of occurrence of +230G/A polymorphism of the MBL gene in residents of St. Petersburg. *Medline.ru*, 2006, vol. 7, no. 1, pp. 372–377. (In Russ.)]
2. Терещенко С.Ю., Каспаров Э.В., Смольникова М.В., Кувшинова Е.В. Дефицит маннозосвязывающего лектина при заболеваниях респираторного тракта // Пульмонология. 2016. Т. 26, № 6. С. 748–752. [Tereshchenko S.Yu., Kasparov E.V., Smolnikova M.V., Kuvshinova E.V. Mannose-binding lectin deficiency in respiratory diseases. *Pulmonologiya = Russian Pulmonology*, 2016, vol. 26, no. 6, pp. 748–752. (In Russ.)] doi: 10.18093/0869-0189-2016-26-6-748-752
3. Терещенко С.Ю., Смольникова М.В. Врожденные дисфункции паттерн-распознающих рецепторов в патогенезе инвазивной и рецидивирующей пневмококковой инфекции у детей // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 229–238. [Tereshchenko S.Yu., Smolnikova M.V. Congenitally impaired pattern-recognition receptors in pathogenesis of pediatric invasive and recurrent pneumococcal infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 229–238. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-229-238
4. Bernig T., Breunis W., Brouwer N., Hutchinson A., Welch R., Roos D., Kuijpers T., Chanock S. An analysis of genetic variation across the MBL2 locus in Dutch Caucasians indicates that 3' haplotypes could modify circulating levels of mannose-binding lectin. *Hum. Genet.*, 2005, vol. 118, no. 3–4, pp. 404–415. doi: 10.1007/s00439-005-0053-5
5. Bjarnadottir H., Arnardottir M., Ludviksson B.R. Frequency and distribution of FCN2 and FCN3 functional variants among MBL2 genotypes. *Immunogenetics*, 2016, vol. 68, no. 5, pp. 315–325. doi: 10.1007/s00251-016-0903-4
6. Bjarnadottir H., Ludviksson B.R. Inherited deficiency of the initiator molecules of the lectin-complement pathway. *Laeknabladid*, 2010, vol. 96, pp. 611–617. doi: 10.17992/ibl.2010.10.319
7. Brodzki N., Frazer-Abel A., Grumach A.S., Kirschfink M., Litzman J., Perez E., Seppänen M.R.J., Sullivan K.E., Jolles S. European Society for Immunodeficiencies (ESID) and European Reference Network on Rare Primary Immunodeficiency, Autoinflammatory and Autoimmune Diseases (ERN RITA) Complement Guideline: deficiencies, diagnosis, and management. *J. Clin. Immunol.*, 2020, vol. 40, no. 4, pp. 576–591. doi:10.1007/s10875-020-00754-1
8. Cedzynski M., Nuytinck L., Atkinson A.P., Swierzko A.St., Zeman K., Szemraj J., Szala A., Turner M.L., Kilpatrick D.C. Extremes of L-ficolin concentration in children with recurrent infections are associated with single nucleotide polymorphisms in the FCN2 gene. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, vol. 150, no. 1, pp. 99–104. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03471.x
9. Chalmers J.D., Mchugh B.J., Doherty C., Smith M.P., Govan J.R., Kilpatrick D.C., Hill A.T. Mannose-binding lectin deficiency and disease severity in non-cystic fibrosis bronchiectasis: a prospective study. *Lancet Respir. Med.*, 2013, vol. 1, no. 3, pp. 224–232. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70001-8
10. Eisen D.P., Osthoff M. If there is an evolutionary selection pressure for the high frequency of MBL2 polymorphisms, what is it? *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, vol. 176, no. 2, pp. 165–171. doi: 10.1111/cei.12241

11. Garcia-Laorden M.I., Sole-Violan J., Rodriguez de Castro F., Aspa J., Briones M.L., Garcia-Saavedra A., Rajas O., Blanquer J., Caballero-Hidalgo A., Marcos-Ramos J.A., Hernandez-Lopez J., Rodriguez-Gallego C. Mannose-binding lectin and mannanose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, vol. 122, no. 2, pp. 368–374. doi: 10.1016/j.jaci.2008.05.037
12. Garred P., Honore C., Ma Y.J., Munthe-Fog L., Hummelshøj T. MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3-The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. *Mol. Immunol.*, 2009, vol. 46, no. 14, pp. 2737–2744. doi: 10.1016/j.molimm.2009.05.005
13. Hegele R.A., Busch C.P., Young T.K., Connelly P.W., Cao H. Mannose-binding lectin gene variation and cardiovascular disease in Canadian Inuit. *Clin. Chem.*, 1999, vol. 45, no. 8, pt 1, pp. 1283–1285.
14. Hummelshøj T., Munthe-Fog L., Madsen H.O., Fujita T., Matsushita M., Garred P. Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. *Hum. Mol. Genet.*, 2005, vol. 14, pp. 1651–1658. doi: 10.1093/hmg/ddi173
15. Ip W.K.E., Chan K.H., Law H.K.W., Tso G.H.W., Kong E.K.P., Wong W.H.S., To Y.F., Yung R.W.H., Chow E.Y., Au K.L., Chan E.Y.T., Lim W., Jensenius J.C., Turner M.W., Peiris J.S.M., Lau Y.L. Mannose-binding lectin in severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Infect. Dis.*, 2005, vol. 191, no. 10, pp. 1697–1704. doi: 10.1086/429631
16. Madsen H.O., Satz M.L., Hogh B., Garred P. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J. Immunol.*, 1998, vol. 161, no. 6, pp. 3169–3175.
17. Matricardi P.M., Negro R.W.D., Nisin R. The first, holistic immunological model of COVID-19: Implications for prevention, diagnosis, and public health measures. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2020, vol. 31, no. 5, pp. 454–470. doi: 10.1111/pai.13271
18. Mishra A., Antony J.S., Sundaravivel P., Tong H.V., Meyer C.G., Jalli R.D., Velavan T.P., Thangaraj K. Association of ficolin-2 serum levels and FCN2 genetic variants with Indian visceral leishmaniasis. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 5: e0125940. doi: 10.1371/journal.pone.0125940
19. Munthe-Fog L., Hummelshøj T., Hansen B.E., Koch C., Madsen H.O., Skjodt K., Garred P. The impact of FCN2 polymorphisms and haplotypes on the ficolin-2 serum levels. *Scand. J. Immunol.*, 2007, vol. 65, no. 4, pp. 383–392. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.01915.x
20. Notarangelo L., Casanova J.-L., Fischer A., Puck J., Rosen F., Seger R., Geha R. Primary immunodeficiency diseases: an update. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004, vol. 114, no. 3, pp. 677–687. doi: 10.1016/j.jaci.2004.06.044
21. Smolnikova M.V., Freidin M.B., Tereshchenko S.Y. The prevalence of the variants of the L-ficolin gene (FCN2) in the arctic populations of East Siberia. *Immunogenetics*, 2017, vol. 69, no. 6, pp. 409–413. doi: 10.1007/s00251-017-0984-8
22. Stengaard-Pedersen K., Thiel S., Gadjeva M., Møller-Kristensen M., Sørensen R., Jensen L.T., Sjøholm A.G., Fugger L., Jensenius J.C. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. *N. Engl. J. Med.*, 2003, vol. 349, no. 6, pp. 554–560. doi: 10.1056/NEJMoa022836
23. Tereshchenko S.Y., Smolnikova M.V., Freidin M.B. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in the East Siberia and Russian Arctic populations. *Immunogenetics*, 2020, vol. 72, no. 6–7, pp. 347–354. doi: 10.1007/s00251-020-01175-5
24. Thiel S., Kolev M., Degn S., Steffensen R., Hansen A.G., Ruseva M., Jensenius J.C. Polymorphisms in mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease 2 affect stability, binding to MBL, and enzymatic activity. *J. Immunol.*, 2009, vol. 182, pp. 2939–2947. doi: 10.4049/jimmunol.0802053
25. Thiel S., Steffensen R., Christensen I.J., Ip W.K., Lau Y.L., Reason I.J.M., Eiberg H., Gadjeva M., Ruseva M., Jensenius J.C. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. *Genes Immun.*, 2007, vol. 8, pp. 154–163. doi: 10.1038/sj.gene.6364373
26. Trolborg A., Hansen A., Hansen S.W., Jensenius J.C., Stengaard-Pedersen K., Thiel S. Lectin complement pathway proteins in healthy individuals. *Clin. Exp. Immunol.*, 2017, vol. 188, no. 1, pp. 138–147. doi: 10.1111/cei.12909

Авторы:

Смольникова М.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель группы молекулярно-генетических исследований НИИ медицинских проблем Севера — обособленного подразделения ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия;
Малинчик М.А., младший научный сотрудник НИИ медицинских проблем Севера — обособленного подразделения ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия;
Терещенко С.Ю., д.м.н., профессор, зав. клиническим отделением соматического и психического здоровья детей НИИ медицинских проблем Севера — обособленного подразделения ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Smolnikova M.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Head of the Molecular Genetic Research Group, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation;
Malinichik M.A., Junior Researcher, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation;
Tereshchenko S.Yu., PhD, MD (Medicine), Head of the Clinical Department of Somatic and Mental Health of Children, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.03.2021
 Принята к печати 18.02.2022

Received 30.03.2021
 Accepted 18.02.2022

SPUTUM SMEAR POSITIVITY GRADE AND CHEST X-RAY FINDINGS IN TUBERCULOSIS: A CROSS-SECTIONAL STUDY

R. Behzadmehr, E. Nejadkehkhah

Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran

Abstract. Despite many advances in the diagnosis, screening, and rapid treatment of tuberculosis, it is still a public health concern in the world. Due to the importance of this issue in diagnosis and reduction of transmission of infection and treatment of the disease especially where this study was conducted due to the high prevalence of tuberculosis, the aim of our study was to determine the relationship between sputum smear positivity grade and chest X-ray findings in pulmonary tuberculosis patients in a hospital in southeast of Iran. This cross-sectional study was performed on all patients with pulmonary TB referencing the health centers in the Zabol city from January 1, 2015 to December 30, 2020. Sputum smear and radiographic findings of the chest X-ray were evaluated. Data was collected using a form of information and finally analyzed by SPSS 22. Out of 101 patients examined in the present study, 71 were women and 30 were men. The mean age of the patients was 62.68 ± 13.61 years. The frequency of opacity in patients with grades 1, 2, and 3 was 71.4, 78.5, and 76.5%, respectively. Frequency of cavitation in patients with grade 1, 2 and 3 was 11.5%, 28.5% and 52.9% respectively (P value 0.001). The frequency of reticulonodular presentations in patients with grade 1, 2, and 3 was 24.2, 7.1, and 0%, respectively. In general, the results of this study showed that, with increasing grading of smears (1+, 2+, and 3+), the frequency of cavitation presentation increased significantly and the frequency of reticulonodular presentations decreased significantly. The findings of the present study can help physicians to improve TB diagnostics.

Key words: cross-sectional studies, sputum, X-ray, tuberculosis, radiography.

ВЗАИМОСВЯЗЬ СТЕПЕНИ ПОЗИТИВНОСТИ МАЗКА МОКРОТЫ И РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ ОРГАНОВ ГРУДНОЙ КЛЕТКИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ: ОДНОМОМЕНТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Безадмер Р., Нежадкхех Э.

Забольский университет медицинских наук, г. Заболь, Иран

Резюме. Несмотря на многочисленные достижения в диагностике, скрининге и лечении туберкулеза, он по-прежнему остается проблемой общественного здравоохранения во всем мире. Ввиду важности этого вопроса для диагностики, снижения уровня распространения инфекции и лечения заболевания мы определяли взаимосвязь между степенью позитивности мокроты и рентгенологической картиной грудной клетки у больных туберкулезом легких на юго-востоке Ирана. Данный регион был выбран для проведения настоящего исследования по причине высокой распространенности в нем туберкулеза. Поперечное исследование было проведено с вовлечением всех пациентов с легочным туберкулезом в медицинских центрах города Заболь с 1 января 2015 года по 30 декабря 2020 года. Были изучены мазки мокроты и рентгенологические данные грудной клетки.

Адрес для переписки:

Разиех Безадмер
Иран, г. Заболь, Забольский университет медицинских наук.
E-mail: razbebehzadmehr@gmail.com

Contacts:

Razieh Behzadmehr
Iran, Zabol, Zabol University of Medical Sciences.
E-mail: razbebehzadmehr@gmail.com

Для цитирования:

Безадмер Р., Нежадкхех Э. Взаимосвязь степени позитивности мазка мокроты и рентгенологической картины органов грудной клетки при туберкулезе: одномоментное исследование // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 551–555. doi: 10.15789/2220-7619-SSP-1709

Citation:

Behzadmehr R., Nejadkehkhah E. Sputum smear positivity grade and chest X-ray findings in tuberculosis: a cross-sectional study // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 551–555. doi: 10.15789/2220-7619-SSP-1709

Результаты каждого пациента были внесены в специально разработанную форму и проанализированы с помощью программы SPSS 22. В исследовании принял участие 101 пациент — 71 женщина и 30 мужчин. Средний возраст пациентов составил $62,68 \pm 13,61$ года. Частота затемнения легочного рисунка у пациентов с позитивностью мазка 1, 2 и 3 степени составила 71,4, 78,5 и 76,5% соответственно. Частота обнаружения каверн в легких у пациентов с позитивностью мазка 1, 2 и 3 степени составила 11,5, 28,5 и 52,9% соответственно (значение $p = 0,001$), а частота ретикулонодулярных признаков — 24,2, 7,1 и 0% соответственно. В целом результаты этого исследования показали, что с увеличением степени позитивности мазков (1+, 2+ и 3+) частота формирования каверн в легких существенно увеличивалась, а частота ретикулонодулярных проявлений значительно снижалась. Результаты настоящего исследования могут быть полезны практикующим врачам для диагностики туберкулеза.

Ключевые слова: *кросс-секционные исследования, мокрота, рентген легких, туберкулез, рентгенография.*

Introduction

Despite many advances in the diagnosis, screening, and rapid treatment of tuberculosis, it is still a public health concern in the world. According to the latest WHO report, more than 10 million people worldwide are infected with tuberculosis. Geographically, most TB patients are in Africa and EMRO [20].

According to the latest meta-analysis reports, the prevalence of TB in Iran is 23% [13] to 27% [6]. TB is the biggest cause of death among single-agent infectious diseases (even more so than AIDS, malaria, and measles) and has a tenth-highest global burden of disease, and is expected to continue to maintain its present status until 2020 [9]. The basis of the diagnosis of pulmonary tuberculosis is a direct and simple screening of susceptible patients. In the best of cases, the sensitivity of the sputum test to detect pulmonary tuberculosis is fifty to sixty percent [17]. By the standard definition, patients who experience at least two positive sputum smear tests, or have only a positive sputum smear test for bacilli acid-fast associated with radiographic changes in the chest X-ray, or a positive smear for acid bacilli in addition to a positive culture are considered as positive for active tuberculosis [2, 12, 21]. The grade of the smear is determined by the bacillary load in each microscopic field. Some studies have found that the grade of primary smear can be considered as a predictive factor of patient's morbidity and mortality, which, in the case of a higher grade of positivity, it is more likely to be a failure in treatment and cause death [7, 18]. In some studies, the relationship between the grade of primary positive smear and increased clinical manifestations has been stated [19]. Chest X-ray is also a suitable and sensitive diagnostic tool for detecting pulmonary lesions, including in tuberculosis, so that in the case of a normal chest X-ray, the diagnosis of tuberculosis is partially excluded [8, 12]. On the other hand, in cases where this disease is actively sought, and when it is diagnosed at an early stage, pulmonary involvement can be a sign of our success in the early detection of these patients, resulting from radiographic findings [7]. Based on the researcher's best knowledge there is no study has been

conducted to investigate the relationship between the findings of chest X-ray radiography and the grade of positivity of sputum smear in Iran and especially Southeast of Iran as an area with a high prevalence of tuberculosis. According to the statistics of the Ministry of Health of Iran, Sistan and Baluchestan province and Zabol city are the most common cities for tuberculosis in Iran [1, 10].

Some studies have been done in this regard, and due to the importance of this issue in diagnosis and reduction of transmission of infection and treatment of the disease especially where this study is conducted due to the high prevalence of tuberculosis, this study was done to determine The relationship between sputum smear positivity grade and chest X-ray findings in pulmonary tuberculosis patients in a hospital in southeast of Iran.

Materials and methods

This cross-sectional study was performed on all patients with pulmonary TB referencing the health centers in the Zabol city, southeast of Iran, from January 1, 2015 to December 30, 2020.

In this study, the national TB diagnosis protocol based on the WHO guidelines was used to diagnose TB in included patients. Patients over 18 years of age were included. Patients without smear grading that had chest radiographs were excluded. A researcher-made checklist for collecting information. The checklist were containing demographic information, smear positivity grading, and chest radiographs. The study protocol approved has in the Ethics Committee of Zabol University of Medical Sciences. Written consent was obtained from all participants prior to the study. Participants were assured that their information would be kept confidential. STROBE checklist was used to report the study.

The patient's characteristics were described using descriptive tests including mean, standard deviation, frequency, and percentage. The Kolmogorov–Smirnov test was used to evaluate data normality. SPSS Version 22 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used to analyze the data. The confidence interval of 95% and a significance level of P-value less than 0.05 was considered significant.

Results

Of the 101 participants, 71 (70.3%) were male and the rest were women. The mean age of patients was 62.68 years with a standard deviation of 13.61. The youngest and oldest patients were 18 and 86 years old respectively. Women with a sputum positivity grade of 1, 2, and 3 were 73.3%, 50%, and 70.6%, respectively, and the prevalence of men in grade 1, 2, and 3 was 25.7%, 50%, and 29.4%. There was no significant difference between the two sexes in terms of smear grade ($p = 0.192$). The following table shows that the frequency of consolidation in 3 chest X-rays of patients with smear grade of 1, 2, 3 and was 71.4, 78.5, and 76.5%, respectively. This difference in the size of consolidation in patients with different grades was not statistically significant ($p = 0.833$) (Table 1).

The following table shows that the frequency of cavitation in patients with grade 1, 2, and 3 was 11.5%, 28.5%, and 52.9% respectively. This difference in the frequency of cavity was statistically significant in three groups ($p = 0.001$) (Table 2).

The following table shows that nodular presentations in patients with grades 1, 2, and 3 were 18.6, 42.8, and 35.3%, respectively. This difference was not statistically significant in the three groups ($p = 0.086$) (Table 3).

The following table shows that the prevalence of reticulonodular involvement in patients with grade 1, 2, and 3 was 24.2%, 7.1%, and 0.0%, respectively. The difference between the frequency of reticulonodular involvement in the three groups was statistically significant ($p = 0.022$) (Table 4).

Discussion

Among the studied patients 70 had grade 1 (74.3% female and 25.7% male), 14 had grade 2 (male = female) and 17 grade 3 (70.6% female and 35.7% male). There was no significant difference between the sexes in terms of smear grade. The findings of this study cannot be compared to any other studies because of the lack of similar research on the relation between sex and grading of the smear. The mean age of patients was 62.68 years with a standard deviation of 13.61. The youngest and oldest patients were 18 and 86 years old. The mean age of patients with grades 1, 2, and 3 was 64.47, 62.07, and 55.82 years, respectively. The age difference of patients in different grades was not statistically significant. Also there was no relation between age and grading of the smear. The frequency of consolidation in patients with grades 1, 2, and 3 was 71.4, 78.5, and 76.5%, respectively. The difference in the degree of opacity in patients with different grades was not statistically significant. Although grade 2 patients were more frequent than grade 1 and grade 3 patients, the difference between the three groups was not significant. There does not seem to be any relation

Table 1. Frequency of consolidation in chest X-ray in association with the grading of sputum smear

Grade of smear positivity		Grade1	Grade2	Grade3	P-value
Consolidation	Yes	50 71.4%	11 78.5%	13 76.5%	0.833
	No	20 28.5%	3 21.4%	4 23.5%	

Table 2. Frequency of cavitation by the degree of smear

Grade of smear positivity		Grade1	Grade2	Grade3	P-value
Cavitation	Yes	8 11.5%	4 28.5%	9 52.9%	0.001
	No	62 88.5%	10 71.4%	8 47.05%	

between the degree of smear and the consolidation in the graph. This finding is not consistent with other studies. In the study of Parcell B.J. et al. (2017), with increasing the degree of smear (+1, +2, +3 or +4), the frequency of consolidation increased significantly (in degrees +1, +2, +3, the frequency of consolidation was +4 81%, 95%, 100% respectively) [14]. In the study of Brahmapurkar K.P. et al. (2017), with increasing the grade of smear positivity, the number of cases also increased significantly [4] which can be the reason for this inconsistency. Bisognin F. et al. (2019) also showed that the frequency of opacity increased with increasing the number of acid bacilli [3]. The difference between the findings of the present and other studies could be attributed to the fact that the present study focused on investigating chest radiographs based on smear grading, while other studies examined the relation between CT scan and HRCT with smear grading. The frequency of cavitation in patients with grades 1, 2, and 3 was 11.5%, 28.5%,

Table 3. Frequency of nodular presentation by the grade of sputum smear positivity

Grade of smear positivity		Grade1	Grade2	Grade3	P-value
Nodular presentation	Yes	13 18.6%	6 42.8%	6 35.3%	0.086
	No	57 81.4%	8 57.1%	11 64.7%	

Table 4. Frequency of reticulonodular presentation by the grade of smear positivity

Grade of smear positivity		Grade1	Grade2	Grade3	P-value
Reticulonodular	Yes	17 24.2%	1 7.1%	0 0%	0.022
	No	53 75.7%	13 92.8%	17 100%	

and 52.9% respectively. This difference in the frequency of cavity was statistically significant in three groups. Different types of patients had different cavitation levels; in patients with grade 3 cavitation, there was a significant increase in grade 3 and grade 1 patients. Therefore, there seems to be a relation between the degree of smear and the presence of cavity. In the study of M. Saffari et al. (2017), with the increase in the degree of smear (+1, +2, +3, or +4), the frequency of CT scan findings including cavitation also increased significantly, so that the frequency of cavitation cases in degrees +1, +2, +3, and +4 was 33%, 68%, 94% and 100% respectively [16]. In the study of Penn-Nicholson A. et al. (2019) with the increasing of the degree of smear, cavitation also increased significantly [15]. Matsuoka S. et al. (2004) also showed that the frequency of covariation increased with the increasing of the number of acid bacilli [11]. In the study of Hassanzad M. et al. (2015), cavitation had a significant correlation with smear gradation [5]. This study showed that nodular facial abnormalities in patients with grade 1, 2, and 3 were 18.6, 42.8, and 35.3%, respectively. Nodular features were not significantly different in three groups. Although grade 2 patients had more nodular features in comparison with grade 1 and grade 3 patients, the difference between three groups was not significant; therefore, there is no significant relation between the degree of smear and nodular feature abnormalities. Matsuoka S. et al. (2004) also showed that the incidence of nodular presentation increased with the increasing degree of smear, but their differences were not statistically significant [11].

The incidence of reticulonodular involvement in patients with grades 1, 2, and 3 was 24.2%, 7.1%, and 0%. This difference in the frequency of reticulonodular involvement in three groups was statistically significant. On the other hand, patients with reticulonodular involvement were significantly more likely to have a grade 1 smear. The lowest frequency of reticulonodular appearance was associated with to grade 3. These results showed that there is a significant relationship between the degree of smear and reticulonodular involvement in a way that an increase in the grade of smear (1+, 2+, 3+) decreases the frequency of reticulonodular appearance. The findings

of this study cannot be compared to any other studies because of the lack of similar research on the relation between sex and grading of the smear. The most important limitations of the present study were:

- this is a cross-sectional study.
- when interpreting the results, the specific limitations of this type of study should be considered.
- the most important strength of this study was that this is the first report in this long period of this region as the most common area of the tuberculosis outbreak.

Conclusion

In general, the results of this study showed that, with the increasing grading of smears, the frequency of cavitation presentation increased significantly and the frequency of reticulonodular presentations decreased significantly. The findings of the present study can help physicians to improve TB diagnostics.

Conflict of interest

All authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

We would like to thank the Research Deputy of Zabol University of Medical Science and The Head of Health Centers for cooperation in collecting data.

Funding statement

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

Author contributions

RB and EN designed the study. EN collected, analyzed, interpreted data and wrote the manuscript. RB analyzed data, reviewed and revised the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

References

1. Abedipour F., Tirabadi N.M., Khodaverdi E., Roham M. A Review of drug-resistant tuberculosis, risk factors and TB epidemiology and incidence in sistan and baluchestan province. *Eur. J. Mol. Clin. Med.*, 2020, vol. 7, no. 11, pp. 4435–4443.
2. Ayaz M., Shaukat F., Raja G. Ensemble learning-based automatic detection of tuberculosis in chest X-ray images using hybrid feature descriptors *Phys. Eng. Sci. Med.*, 2021, vol. 44, no. 1, pp. 183–194. doi: 10.1007/s13246-020-00966-0
3. Bisognin F., Amodio F., Lombardi G., Bacchi Reggiani M., Vanino E., Attard L., Tadolini M., Re M.C., Dal Monte P. Predictors of time to sputum smear conversion in patients with pulmonary tuberculosis under treatment. *New Microbiol.*, 2019, vol. 42, no. 3, pp. 171–175.
4. Brahmapurkar K.P., Brahmapurkar V.K., Zodpey S.P. Sputum smear grading and treatment outcome among directly observed treatment-short course patients of tuberculosis unit, Jagdalpur, Bastar. *J. Family Med. Prim. Care*, 2017, vol. 6, no. 2, pp. 293–296. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc_24_16

5. Hassanzad M., Khalilzadeh S., Bloorsaz M.R., Velayati A.A. Diagnostic criteria in children with tuberculosis. *Int. J. Mycobacteriol.*, 2015, vol. 4, no. 5, p. 103.
6. Jimma W., Ghazisaeeedi M., Shahmoradi L., Abdurahman A.A., Kalhori S.R.N., Nasehi M., Yazdi S., Safdari R. Prevalence of and risk factors for multidrug-resistant tuberculosis in Iran and its neighboring countries: systematic review and meta-analysis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2017, vol. 50, no. 3, pp. 287–295. doi: 10.1590/0037-8682-0002-2017
7. Kebede W., Gudina E.K., Balay G., Abebe G. Diagnostic implications and inpatient mortality related to tuberculosis at Jimma Medical Center, southwest Ethiopia. *J. Clin. Tuberc. Other Mycobact. Dis.*, 2021, vol. 23: 100220. doi: 10.1016/j.jctube.2021.100220
8. Krusiński A., Grzywa-Celińska A., Szewczyk K., Grzycka-Kowalczyk L., Emeryk-Maksymiuk J., Milanowski J. Various forms of tuberculosis in patients with inflammatory bowel diseases treated with biological agents. *Int. J. Inflam.*, 2021, vol. 2021: 6284987. doi: 10.1155/2021/6284987
9. Kyu H.H., Maddison E.R., Henry N.J., Ledesma J.R., Wiens K.E., Reiner Jr.R., Biehl M.H., Shields C., Osgood-Zimmerman A., Ross J.M. Global, regional, and national burden of tuberculosis, 1990–2016: results from the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors 2016 Study. *Lancet Infect. Dis.*, vol. 18, no. 12, pp. 1329–1349. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30625-X
10. Marvi A., Asadi-Aliabadi M., Darabi M., Rostami-Maskopae F., Siamian H., Abedi G. Silent changes of tuberculosis in Iran (2005–2015): A joinpoint regression analysis. *J. Family Med. Prim. Care*, 2017, vol. 6, no. 4, pp. 760–765. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc_190_17
11. Matsuoka S., Uchiyama K., Shima H., Suzuki K., Shimura A., Sasaki Y., Yamagishi F. Relationship between CT findings of pulmonary tuberculosis and the number of acid-fast bacilli on sputum smears. *Clin. Imaging.*, 2004, vol. 28, no. 2, pp. 119–123. doi: 10.1016/S0899-7071(03)00148-7
12. Nakiyingi L., Bwanika J.M., Ssengooba W., Mubiru F., Nakanjako D., Joloba M.L., Mayanja-Kizza H., Manabe Y.C. Chest X-ray interpretation does not complement Xpert MTB/RIF in diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis among TB-HIV co-infected adults in a resource-limited setting. *BMC Infect. Dis.*, 2021, vol. 21, no. 1: 63. doi: 10.1186/s12879-020-05752-7
13. Nasiri M.J., Dabiri H., Darban-Sarokhalil D., Rezadehbashi M., Zamani S. Prevalence of drug-resistant tuberculosis in Iran: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Infect. Control*, 2014, vol. 42, no. 11, pp. 1212–1218. doi: 10.1016/j.ajic.2014.07.017
14. Parcell B.J., Jarchow-MacDonald A.A., Seagar A.-L., Laurenson I.F., Prescott G.J., Lockhart M. Three year evaluation of Xpert MTB/RIF in a low prevalence tuberculosis setting: a Scottish perspective. *J. Infect.*, 2017, vol. 74, no. 5, pp. 466–472. doi: 10.1016/j.jinf.2017.02.005
15. Penn-Nicholson A., Hraha T., Thompson E.G., Sterling D., Mbandi S.K., Wall K.M., Fisher M., Suliman S., Shankar S., Hanekom W.A., Janjic N., Hatherill M., Kaufmann S.H.E., Sutherland J., Walzl G., De Groot M.A., Ochsner U., Zak D.E., Scriba T.J.; ACS and GC6–74 Cohort Study Groups. Discovery and validation of a prognostic proteomic signature for tuberculosis progression: a prospective cohort study. *PLoS Med.*, 2019, vol. 16, no. 4: e1002781. doi: 10.1371/journal.pmed.1002781
16. Saffari M., Jolandimi H.A., Sehat M., Nejad N.V., Hedayati M., Zamani M., Ghasemi A. Smear grading and the Mantoux skin test can be used to predict sputum smear conversion in patients suffering from tuberculosis. *GMS Hyg. Infect. Control.*, 2017, vol. 12: Doc12. doi: 10.3205/dgkh000297
17. Shankar S.U., Kumar A.M., Venkateshmurthy N.S., Nair D., Kingsbury R., Velu M., Gupta J., Ahmed J., Hiremath S., Jaiswal R.K. Implementation of the new integrated algorithm for diagnosis of drug-resistant tuberculosis in Karnataka State, India: how well are we doing? *PLoS One*, 2021, vol. 16, no. 1: e0244785. doi: 10.1371/journal.pone.0244785
18. Talluri Rameshwari K., Jayashree K., Anuradha K., Raghuraj Singh Ch., Sumana K. An overview of extra pulmonary tuberculosis in smear negative cases and their analysis. *Int. J. Life Sci. Pharma Res.*, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 204–217. doi: 10.22376/ijpbs/lpr.2021.11.1.L204-217
19. Wang J.Y., Lee L.N., Yu C.J., Chien Y.J., Yang P.C., Group T. Factors influencing time to smear conversion in patients with smear-positive pulmonary tuberculosis. *Respirology*, vol. 14, no. 7, pp. 1012–1019. doi: 10.1111/j.1440-1843.2009.01598.x
20. WHO. Global tuberculosis report 2020: executive summary. Geneva: WHO, 2020. 232 p.
21. Zeng J., Yang Q., Xu D., Chen Q., Huang K., Cai Y., Dai Y., Hai X., Zeng Z., Gong X. Predictive value of a five-biomarker signature to diagnose active pulmonary tuberculosis patients (preprint). 2021. doi: 10.21203/rs.3.rs-148655/v1

Авторы:

Безадмер Р., доцент отделения радиологии, Забольский университет медицинских наук, г. Забол, Иран;
Неджадкхеа Э., врач-терапевт отделения радиологии, Забольский университет медицинских наук, г. Забол, Иран.

Authors:

Behzadmehr R., Associate Professor, Department of Radiology, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran;
Nejadkehkha E., General Physician, Department of Radiology, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.

Поступила в редакцию 27.03.2021
 Принята к печати 08.10.2021

Received 27.03.2021
 Accepted 08.10.2021

COMPARISON OF VITAMIN D LEVELS BETWEEN MOTHERS AND INFANTS WITH AND WITHOUT PROLONGED MEMBRANE RUPTURE

H. Boskabadi^a, F. Rakhshanizadeh^a, M. Zakerihamidi^b

^a Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

^b Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Abstract. *Background.* Premature membrane rupture is a known causes of preterm labor and accounts for approximately one-third of cases. Vitamin D deficiency may play a role in preterm labor as well. *Objective.* The present study aimed to compare vitamin D levels in mothers and infants with and without prolonged rupture of membranes (PROM). *Materials and methods.* This cross-sectional study was conducted with 241 babies, with and without a history of membrane rupture, in mothers in the neonatal ward of Ghaem Hospital, Mashhad, from 2019 to 2021 with available sampling methods. After confirmation of prolonged membrane rupture (more than 18 hours before birth) based on history and examination with a speculum, we completed a data collection tool, a checklist including laboratory evaluation and neonatal and maternal characteristics. The conditions of neonates with and without prolonged membrane rupture were compared. Data were analyzed by T-test and Chi-square. *Results.* We examined a total of 241 neonates including 148 (61.4%) without prolonged rupture of the membranes in mothers and 93 (38.6%) with PROM. There were statistically significant differences between the two groups regarding: maternal vitamin D level ($p = 0.001$); neonatal vitamin D level ($p = 0.001$); and fifth minute Apgar score ($p = 0.003$). These variables were lower in the group of neonates with PROM. *Conclusion.* Vitamin D deficiency in mothers was significantly associated with prolonged membrane rupture. With increasing severity of vitamin D deficiency, the probability of PROM increases and, therefore, the likelihood of preterm labor and its complications rises.

Key words: fetal membranes, prolonged premature rupture of membranes, newborn, vitamin D, Apgar score.

СРАВНЕНИЕ УРОВНЕЙ ВИТАМИНА D У МАТЕРЕЙ И НОВОРОЖДЕННЫХ С ДЛИТЕЛЬНЫМ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫМ РАЗРЫВОМ ПЛОДНЫХ ОБОЛОЧЕК И БЕЗ НЕГО

Х. Боскабади¹, Ф. Рахшанизаде², М. Закерихамиди³

¹ Мешхедский университет медицинских наук, г. Мешхед, Иран

² Исламский университет Азад, филиал Тонкабон, г. Тонкабон, Иран

Резюме. *Актуальность.* Преждевременный разрыв плодных оболочек является одной из причин преждевременных родов и сопровождается примерно одну треть всех родов. Дефицит витамина D также может играть роль в развитии преждевременных родов. Целью настоящего исследования было сравнение уровней витамина D у матерей и младенцев с длительным преждевременным разрывом плодных оболочек и без него. *Материалы и методы.* В настоящее исследование был включен 241 младенец, рожденный на фоне длительного преждевременного разрыва плодных оболочек (ПРПО) и без такового в неонатальном отделении больницы Гаем,

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., Рахшанизаде Ф., Закерихамиди М. Сравнение уровней витамина D у матерей и новорожденных с длительным преждевременным разрывом плодных оболочек и без него // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 556–562. doi: 10.15789/2220-7619-COV-1792

Citation:

Boskabadi H., Rakhshanizadeh F., Zakerihamidi M. Comparison of vitamin D levels between mothers and infants with and without prolonged membrane rupture // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 556–562. doi: 10.15789/2220-7619-COV-1792

Мешхед, с 2019 по 2021 г. После подтверждения ПРПО (более 18 часов до рождения) на основании анамнеза и осмотра с помощью зеркал, было проведено лабораторное исследование и зафиксированы показатели новорожденного и матери. Сравнивали состояние новорожденных с длительным ПРПО и без такового. Статистическую обработку данных проводили, определяя критериев Стьюдента и Пирсона (хи-квадрат). *Результаты.* Обследован 241 новорожденный, в том числе 93 (38.6%) рожденных на фоне длительного ПРПО и 148 (61.4%) без ПРПО. Между двумя группами обнаружена статистически значимая разница в уровне витамина D у матери ($p = 0.001$), в уровне витамина D у новорожденного ($p = 0.001$) и в оценке по шкале Апгар на пятой минуте ($p = 0.003$). Это означает, что величины указанных переменных были ниже в группе новорожденных с ПРПО. *Вывод.* Длительный ПРПО в значительной степени коррелирует с дефицитом витамина D у матерей, а с усилением тяжести дефицита витамина D увеличивается вероятность ПРПО и, следовательно, повышается вероятность преждевременных родов и их осложнений.

Ключевые слова: плодные оболочки, пролонгированный преждевременный разрыв плодных оболочек, новорожденный, витамин D, матери, оценка по шкале Апгар.

Introduction

With a prevalence of 11% worldwide, preterm labor is one of the causes of death and long-term disability of infants and remains a major concern for public health [5]. The amniotic membrane protects the fetus against inflammation, bacteria, and viruses. Prolonged rupture of the membranes means rupture of the amniotic sac more than 18 hours before delivery [15], and it is a risk factor for early neonatal sepsis [2]. Its prevalence is reported to be 4–19% [43], and it is a predisposing factor for about one-third of preterm labors [24]. Maternal risk factors for premature rupture of membranes include age, parity, education, hypertension, cervical length with a history of miscarriage, history of upper urinary tract infection, sexually transmitted infections, positive vaginal culture, history of PROM, addiction, diabetes, placental abruption, preeclampsia, and cerclage. Labor complications of premature membrane rupture involve cesarean section, oligohydramnios, chorioamnionitis, placental abruption, fetal distress, fever at the time of delivery, placenta previa, infection, prenatal bleeding, sepsis in the mother, need for antibiotic therapy, placental retention, and post-partum endometriosis. Prematurity, respiratory distress syndrome, asphyxia, infection, meningitis, sepsis, pneumonia, perinatal mortality, patent arterial duct, necrotizing enterocolitis, intraventricular hemorrhage, and pulmonary hypoplasia are neonatal complications of PROM [11].

Low levels of maternal vitamin D during pregnancy are a risk factor for many adverse outcomes, including preterm labor [28]. The prevalence of vitamin D deficiency in pregnant women in the first and second trimesters is significantly higher than in the third trimester [17]. The fetus relies exclusively on the maternal concentration of 25 hydroxyvitamin D [31]. Vitamin D levels in pregnancy are associated with many maternal and fetal health outcomes. There have been numerous studies regarding an association between 25-hydroxyvitamin D levels in pregnancy and multiple pregnancy complications including gestational hypertension, preeclampsia,

gestational diabetes, time and type of delivery, preterm labor, and fetal complications including skeletal, immune, and respiratory system problems [19, 25]. Vitamin D deficiency in premature neonates is associated with a number of problems (e.g. cerebral hemorrhage, retinopathy of prematurity, infection, and even death) [12]. Thus, correction of maternal vitamin D levels reduces the incidence of prematurity and these important neonatal problems. In the study of Shah B.A. et al., 25-hydroxyvitamin D levels were positively associated with fetal intrauterine growth restriction and prolonged rupture of membranes [36]. In general, prolonged membrane rupture is a serious complication in pregnancy, and it can increase mortality or perinatal morbidity, especially preterm labor and infection [10]. Due to the association between vitamin D deficiency and prematurity, one of the mechanisms of prematurity in vitamin D deficiency may be a membrane rupture. Therefore, in this study, we compared vitamin D levels in infants and mothers with and without a prolonged membrane rupture.

Materials and methods

This cross-sectional study was conducted in the maternity ward, midwifery ward, and NICU of Ghaem Hospital in Mashhad from 2019 to 2020. Prior to enrollment, verbal consent was obtained from the infant's parents. According to Zhang Q's study: the prevalence of placental inflammation in mothers with vitamin D deficiency is 63%; and in mothers without placental inflammation, it is 37%. Using a formula to compare two ratios related to a qualitative trait from two communities, along with alpha coefficient of 0.01 and beta of 0.2, the sample size in each group was estimated to be 87 mothers [14].

Mothers who gave birth to premature infants with more than 18 hours of ruptured amniotic sac were studied as a case group. Mothers without prolonged membrane rupture with preterm labor were included in the study as a control group. Confirmation of ruptured amniotic sac was based on history and speculum examination. We completed the data collection tool, a checklist including laboratory evaluation, and

neonatal and maternal characteristics. Preterm labor is a delivery before 37 weeks of gestation with or without membrane rupture [45]. Premature rupture of the amniotic sac means spontaneous rupture of the fetal membranes before 37 weeks of gestation and before the onset of uterine contractions [29]. Prolonged rupture of the membranes means rupture of the amniotic sac more than 18 hours before delivery [3].

Exclusion criteria included amniotomy, urinary tract infection, vaginal infection, or congenital anomalies. Serum vitamin D was measured from mothers and umbilical cords during delivery, and 1.5 cc of the prepared samples were centrifuged, with serum kept at -20°C and sent for laboratory evaluation. Vitamin D levels were measured using an ELISA method and the model RT2100c reader made in Germany and an ELISA washing device. We considered less than 30 mg/ml of vitamin D as deficient and above 30 mg/ml as sufficient. Vitamin D deficiency cases were divided into three groups: severe deficiency below 10 mg/ml; moderate deficiency 10–20 mg/ml; and mild deficiency 20–30 mg/ml.

Infants in the two groups were compared in terms of neonatal, maternal, and laboratory characteristics. Checklist status was completed based on neonatal information (gestational age, first minute Apgar score, fifth minute Apgar score), maternal information (maternal age, parity), and blood tests (maternal and neonatal vitamin D levels, C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, white blood cell, nucleated red blood cell). All tests, except for the vitamin D test, were requested by the treating physician, and we recorded them without intervention.

After discharge, they were followed up using the Denver II test at 24 months. The Denver Developmental Screening Test II, to assess the growth and development of children from birth to six years old, is divided into four categories: personal/social; fine motor; gross motor; and language. If the infant had a problem in every category (i.e., fine motor skills, gross motor skills, language and personal/social), it would be considered as developmental delay for them. If the infant had: a problem in only one category, it is considered a mild developmental delay; in two categories, a moderate developmental delay; and in three or more categories, a severe de-

velopmental delay. A favorable outcome was defined as normal neurologic and good general condition at the end of the study. Unfavorable outcome was defined as the presence of at least delay in one domain of Denver screening [13].

Statistical analysis. Data were analyzed using t-test, chi-square, and SPSS software version 20. First, we described the results using statistical tables and graphs. We then compared the two groups of infants, with or without prolonged rupture of membrane in mothers, using chi-square and t-test. Correlation methods were used to evaluate the association between the severity of vitamin D deficiency and PROM. The $p \leq 0.05$ level was considered significant in all cases.

Ethical consideration. This study was approved by the Ethics Committee of the Vice Chancellor for Research of Mashhad University of Medical Sciences (No. 991476, IR.MUMS.MEDICAL.REC.1399.623).

Results

In this study, 9 infants were excluded (3 cases of amniotomy, 2 cases of urinary tract infection, 3 cases of vaginal infection, 1 case of congenital anomaly). Finally, we examined 241 neonates including 148 infants without prolonged rupture of membrane and 93 infants with PROM. Based on the results of this study, the mean gestational age was 33.57 ± 3.33 weeks, and the mean maternal vitamin D level was 20.66 ± 13.03 mg/dL. Other characteristics of the studied infants are given in Table 1.

In addition, 36 infants (14.9%) needed resuscitation; 28.6% were born naturally, and 71.4% by cesarean section. In this study, there were statistically significant differences: between maternal vitamin D levels ($p = 0.001$) and neonatal vitamin D levels ($p = 0.001$); in fifth minute Apgar score ($p = 0.003$); and in CRP ($p = 0.032$) (Table 2).

Calculations were performed based on standard deviation \pm mean (t-test).

Twenty percent of infants with PROM had an infection (16% sepsis, 4% meningitis), while 5% of neonates without a history of PROM had an infection. In this study, vitamin D deficiency was significantly associated with prolonged rupture of membranes ($p = 0.0001$), and with increasing severity of vitamin D deficiency, the rate of PROM increased. Mothers with normal vitamin D level had a 29% chance of PROM, which increased to 47% in moderate deficiency and 62% in severe deficiency. There was a moderate association between maternal serum vitamin D and the incidence of PROM ($p = 0.0001$, Spearman's $\rho = 0.286$). Short-term neonatal follow-up showed that the serum level of vitamin D in PROM infants who died was 9.76 ± 1.01 and 12.92 ± 7.67 mg/ml in discharged live neonates ($p = 0.003$). Assessment of neonatal development from PROM mothers by Denver II

Table 1. Mean of variables of mothers and newborns included in the study

Variables	Mean \pm Standard deviation
Mother age, years	30.52 \pm 6.73
Parity	2.01 \pm 1.23
Maternal vitamin D levels, mg/dl	20.66 \pm 13.03
Neonatal vitamin D levels, mg/dl	16.17 \pm 10.78
Gestational age, weeks	33.57 \pm 3.33
First minute Apgar score	7.16 \pm 2.15
Fifth minute Apgar score	8.58 \pm 1.63

Table 2. Comparison of mean variables of mothers and neonates with or without prolonged rupture of membranes

Variables	Groups	Neonates with PROM n = 93 (38.6%)	Neonates without PROM n = 148 (61.4%)	Significance level* (T-Test)
Maternal vitamin D levels, mg/ml		17.29±12.55	22.78±12.92	0.001
Neonatal vitamin D levels, mg/ml		13.09±8.68	18.21±11.56	0.001
Gestational age, weeks		32.88±2.82	33.67±3.40	0.351
First minute Apgar score		6.93±2.04	7.29±2.21	0.213
Fifth minute Apgar score		8.17±1.74	8.83±1.52	0.003
WBC, × 10 ³		16.31±10.90	8.60±4.84	0.059
NRBC		2105.53±5205.55	1325.92±672.93	0.608
ESR		41.75±29.84	1.00±0.00	0.102
CRP		28.21±25.27	16.28±16.63	0.032

Note. The calculations were performed based on standard deviation±mean.

test showed that 35% of neonates at 24 months of age showed some degree of developmental delay. In neonates from mothers without PROM, 12% showed developmental delay ($p = 0.001$). Serum vitamin D levels in children with developmental delay were 13 ± 7 . In the group with normal development, they were 17 ± 11 mg/ml ($p = 0.042$).

Discussion

According to the results of our study, there was a significant relationship between vitamin D deficiency in mothers and infants and prolonged rupture of the membranes, with the likelihood of PROM rising as the severity of vitamin D deficiency increases. Also, for mothers with moderate-to-severe deficiency, the risk of PROM doubles. Studies on the role of vitamin D and the risk of preterm labor, and the possibility of membrane rupture, are contradictory. Numerous studies have shown an association between vitamin D deficiency and increased probability of preterm labor [41]. Rupture of the membranes is one of the possible causes of preterm labor due to vitamin D deficiency [20, 42, 45]. Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preterm labor by approximately 9-fold [32]. Vitamin D deficiency during pregnancy and childbirth may play a role in premature rupture of membranes by a mechanism of placental inflammation [21]. Hence, Frazipour's study revealed that there was no significant association between serum vitamin D level and premature rupture of membranes [21]. The underlying mechanism of the potential protective effect of vitamin D on the risk of preterm labor may be due to the wide variety of immunoregulatory effects of vitamin D.

It seems that vitamin D may protect against preterm labor by reducing infection and inflammation [16], but this has not been confirmed in other studies [33, 39, 40]. Vitamin D is a known modulator of the immune system [14]. It is also an effec-

tive stabilizer of amniotic membranes through non-genomic mechanisms [23]. It is involved in epigenetic changes through DNA methylation in genes that regulate extracellular matrix regeneration and is effective in maintaining the health of amniotic membranes [1]; the health of the amniotic membranes is dependent on the structure of vitamin D [27]. Low levels of vitamin D are associated with bacterial vaginosis [18]. Therefore, with increasing cases of bacterial vaginosis, premature rupture of the membranes occurs. To the best of our knowledge, there is no report in available sources on the relationship between the severity of vitamin D deficiency and the incidence of PROM. We report for the first time the relationship between vitamin D deficiency severity and the increase in the incidence of PROM.

According to the results of our study, PROM increased the risk of definitive neonatal infection more than four-fold. Inflammation and infection of the chorio decidua refers to the mechanism of premature rupture of the membranes. There is a strong association between premature rupture of membranes and inflammation and intrauterine infections, especially in preterm pregnancies [34]. Prolonged rupture of the amniotic sac for more than 18 hours increases the risk of neonatal infection ten-fold. Although the most common complication of prolonged rupture of the membranes is immaturity and its side effects, infection is the most important preventable complication [8]. Women with premature rupture of membranes are highly disposed to chorioamnionitis as a result of increased bacterial colonization of vagina before or after PROM [38]. Decreased collagen in embryonic membranes is a predisposing factor for premature rupture of membranes [9].

In the current study, CRP was significantly higher in PROM neonates. It was associated with high sensitivity, specificity and reliability. Increased CRP relates to the pathological confirmation of chorioamnionitis associated with fever [26]. CRP is the most common biomarker used for neonatal bacterial

sepsis. It is also known as a reliable serum marker for the presence or absence of invasive bacterial infection and antibiotic response in newborns [22]. Boonkasediesha showed that neonatal CRP with a cut-off point of 1.90 mg/ml has a very high sensitivity, specificity and positive predictive value [6]. In the Boskabadi study, 44% of infants with ruptured membranes had elevated CRP [10].

According to the results of our study, vitamin D deficiency in infants born to PROM mothers also increases the risk of death and developmental delay. The results of a study showed vitamin D deficiency was more pronounced in newborns who died. Vitamin D deficiency may increase the likelihood of death of these infants by increasing respiratory problems and infections [7].

In this study, Apgar scores of neonates with prolonged rupture of membranes were lower than newborns without rupture of membranes. However, this difference was not significant in the first minute Apgar score. Preterm rupture of the membranes is one of the most common pregnancy complications that can affect Apgar score [4]. In one study, the duration of the rupture was effective in reducing the Apgar score and increased this risk by 8.5-fold [35]. As the interval between rupture of the membranes and delivery increases, the risk of infection in the mother and fetus rises [37]. In addition to the increased risk of intrauterine infection, other complications such as placenta abruption, pulmonary hypoplasia, hypoxia, and fetal distress due to umbilical cord compression

or prolapse increase [30]. A limitation of our study was a lack of placental examination of the infants under study.

Conclusion

Based on the results of this study, maternal and neonatal vitamin D levels and fifth minute Apgar scores were lower in neonates with prolonged rupture of membranes. With increasing severity of vitamin D deficiency, the probability of PROM was higher. Since vitamin D levels in mothers and neonates are correlated with prolonged rupture of membranes, it is recommended that mothers who are at risk for preterm labor receive vitamin D supplementation during pregnancy. It may reduce the incidence of prolonged membrane rupture or prematurity, with consequent reductions in various associated complications.

Acknowledgements

This study is the result of a Mashhad University of Medical Sciences approved project. We therefore sincerely thank the Deputy Research of the University, the Research Director, other officials, and everyone who helped us with this project.

Conflict of interest statement

The Author(s) declare(s) that there is no conflict of interest.

References

1. Al-Garawi A., Carey V.J., Chhabra D., Mirzakhani H., Morrow J., Lasky-Su J., Qiu W., Laranjo N., Litonjua A.A., Weiss S.T. The role of vitamin D in the transcriptional program of human pregnancy. *PLoS One*, 2016, 11: e0163832. doi: 10.1371/journal.pone.0163832
2. Al-Lawama M., Alzaatreh A., Elrajabi R., Abdelhamid S., Badran E. Prolonged rupture of membranes, neonatal outcomes and management guidelines. *J. Clin. Med. Res.*, 2019, vol. 11, pp. 360–366. doi: 10.14740/jocmr3809
3. Al-Qaqa K., Al-Awaysheh F. Neonatal outcome and prenatal antibiotic treatment in premature rupture of membranes. *Pak. J. Med. Sci.*, 2005, vol. 21, no. 4, pp. 441–444.
4. Ansari F.N.A.S. Neonatal complications of premature rupture of membranes. *Acta Medica Iranica*, 2003, vol. 41, no. 3, pp. 175–179.
5. Beck S., Wojdyla D., Say L., Betran A.P., Merialdi M., Requejo J.H., Rubens C., Menon R., Van Look P.F. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization*, 2010, vol. 88, no. 1, pp. 31–38.
6. Boonkasidecha S., Panburana J., Chansakulporn S., Benjasuwantep B., Kongsomboon K. An optimal cut-off point of serum C-reactive protein in prediction of neonatal sepsis. *J. Med. Assoc. Thai*, 2013, vol. 96, suppl. 1, pp. S65–S70.
7. Boskabadi H., Maamouri G., Hemmatipour A., Parvini Z., Ramazani A., Bagheri F. Comparison of serum vitamin D in the umbilical cord of survived with not survived premature infants. *Iranian Journal of Pediatrics*, 2019, vol. 29, iss. 3: e84798. doi: 10.5812/ijp.84798
8. Boskabadi H., Maamouri G., Mafinejad S. Neonatal complications related with prolonged rupture of membranes. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2011, vol. 4, pp. 93–98. doi: 10.3889/MJMS.1857-5773.2011.0159
9. Boskabadi H., Saghafi N., Najafi A. Comparing the efficacy of cefotaxime and ampicillin on neonatal infection after premature rupture of membranes. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*, 2014, vol. 17: 93. doi: 10.22038/IJOGI.2014.2746
10. Boskabadi H., Zakeri Hamidi M., Maamouri G., Najafi A. Frequency of maternal risk factors and neonatal complications of premature rupture of membranes. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 2016, vol. 18, no. 10, pp. 32–39. doi: 10.22088/jbums.18.10.32
11. Boskabadi H., Zakerihamidi M. Evaluation of maternal risk factors, delivery, and neonatal outcomes of premature rupture of membrane: a systematic review study. *J. Pediatr. Rev.*, 2019, vol. 7, no. 2, pp. 77–88. doi: 10.32598/jpr.7.2.77
12. Boskabadi H., Zakerihamidi M., Faramarzi R. The vitamin D level in umbilical cord blood in premature infants with or without intra-ventricular hemorrhage: a cross-sectional study. *Int. J. Reprod. Biomed.*, 2018, vol. 16, no. 7, pp. 429–434.

13. 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
14. Calton E.K., Keane K.N., Newsholme P., Soares M.J. The impact of vitamin D levels on inflammatory status: a systematic review of immune cell studies. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 11: e0141770. doi: 10.1371/journal.pone.0141770
15. Canavan T.P., Simhan H.N., Caritis S. An evidence-based approach to the evaluation and treatment of premature rupture of membranes: Part I. *Obstet. Gynecol. Surv.*, 2004, vol. 59, no. 9, pp. 669–677. doi: 10.1097/01.ogx.0000137610.33201.a4
16. Chesney R.W. Vitamin D and The Magic Mountain: the anti-infectious role of the vitamin. *J. Pediatr.*, 2010, vol. 156, no. 5, pp. 698–703. doi: 10.1016/j.jpeds.2010.02.002
17. Choi R., Kim S., Yoo H., Cho Y.Y., Kim S.W., Chung J.H., Oh S.Y., Lee S.Y. High prevalence of vitamin D deficiency in pregnant Korean women: the first trimester and the winter season as risk factors for vitamin D deficiency. *Nutrients*, 2015, vol. 7, no. 5, pp. 3427–3448. doi: 10.3390/nu7053427
18. Cooper N.A., Moores R.; East London Preterm Prevention Collaboration. A review of the literature regarding nutritional supplements and their effect on vaginal flora and preterm birth. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 2014, vol. 26, no. 6, pp. 487–492. doi: 10.1097/GCO.0000000000000126
19. Curtis E.M., Moon R.J., Harvey N.C., Cooper C. Maternal vitamin D supplementation during pregnancy. *Br. Med. Bull.*, 2018, vol. 126, no. 1, pp. 57–77. doi: 10.1093/bmb/ldy010
20. Davis L.M., Chang S.C., Mancini J., Nathanson M.S., Witter F.R., O'Brien K.O. Vitamin D insufficiency is prevalent among pregnant African American adolescents. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.*, 2010, vol. 23, no. 1, pp. 45–52. doi: 10.1016/j.jpag.2009.05.005
21. Farzipour S., Jalilvand F., Amani F., Kazemi M., Nikjou R., Shahbazadegan S. Relationship of maternal vitamin D level with premature rupture of fetal membranes. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*, 2020, vol. 23, no. 1, pp. 33–39.
22. Fukuzumi N., Osawa K., Sato I., Iwatani S., Ishino R., Hayashi N., Iijima K., Saegusa J., Morioka I. Age-specific percentile-based reference curve of serum prolactin concentrations in Japanese preterm infants. *Sci Rep.*, 2016, vol. 6: 23871. doi: 10.1038/srep23871
23. Gibson C.C., Davis C.T., Zhu W., Bowman-Kirigin J.A., Walker A.E., Tai Z., Thomas K.R., Donato A.J., Lesniewski L.A., Li D.Y. Dietary vitamin D and its metabolites non-genomically stabilize the endothelium. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 10: e0140370. doi: 10.1371/journal.pone.0140370
24. Goldenberg R.L., Culhane J.F., Iams J.D., Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*, 2008, vol. 371, no. 9606, pp. 75–84. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60074-4
25. Harvey N.C., Holroyd C., Ntani G., Javaid K., Cooper P., Moon R., Cole Z., Tinati T., Godfrey K., Dennison E., Bishop N.J., Baird J., Cooper C. Vitamin D supplementation in pregnancy: a systematic review. *Health Technol Assess*, 2014, vol. 18, no. 45, pp. 1–190. doi: 10.3310/hta18450
26. Hawrylyshyn P., Bernstein P., Milligan J.E., Soldin S., Pollard A., Papsin F.R. Premature rupture of membranes: the role of C-reactive protein in the prediction of chorioamnionitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1983, vol. 147, no. 3, pp. 240–246. doi: 10.1016/0002-9378(83)91104-3
27. Hollis B.W., Wagner C.L. New insights into the vitamin D requirements during pregnancy. *Bone Res.*, 2017, vol. 5: 17030. doi: 10.1038/boneres.2017.30
28. Kiely M.E., Zhang J.Y., Kinsella M., Khashan A.S., Kenny L.C. Vitamin D status is associated with uteroplacental dysfunction indicated by pre-eclampsia and small-for-gestational-age birth in a large prospective pregnancy cohort in Ireland with low vitamin D status. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2016, vol. 104, no. 2, pp. 354–361. doi: 10.3945/ajcn.116.130419
29. Kook S.Y., Park K.H., Jang J.A., Kim Y.M., Park H., Jeon S.J. Vitamin D-binding protein in cervicovaginal fluid as a non-invasive predictor of intra-amniotic infection and impending preterm delivery in women with preterm labor or preterm premature rupture of membranes. *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 6: e0198842. doi: 10.1371/journal.pone.0198842
30. Mandel D., Oron T., Mimouni G.S., Littner Y., Dollberg S., Mimouni F.B. The effect of prolonged rupture of membranes on circulating neonatal nucleated red blood cells. *J. Perinatol.* 2005, vol. 25, no. 11, pp. 690–693. doi: 10.1038/sj.jp.7211389
31. Olmos-Ortiz A., Avila E., Durand-Carbajal M., Díaz L. Regulation of calcitriol biosynthesis and activity: focus on gestational vitamin D deficiency and adverse pregnancy outcomes. *Nutrients*, 2015, vol. 7, no. 1, pp. 443–480. doi: 10.3390/nu7010443
32. Oluwole A.A., Okunade K.S., Okojie O.E. Maternal serum vitamin D levels and preterm delivery among low-risk parturients in Lagos, Nigeria. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 2019, vol. 144, no. 2, pp. 216–220. doi: 10.1002/ijgo.12719
33. Park S.H., Lee G.M., Moon J.E., Kim H.M. Severe vitamin D deficiency in preterm infants: maternal and neonatal clinical features. *Korean J. Pediatr.*, 2015, vol. 58, no. 11, pp. 427–433. doi: 10.3345/kjp.2015.58.11.427
34. Romero R., Chaiworapongsa T., Espinoza J. Micronutrients and intrauterine infection, preterm birth and the fetal inflammatory response syndrome. *J. Nutr.*, 2003, vol. 133, suppl. 2, pp. 1668S–1673S. doi: 10.1093/jn/133.5.1668S
35. Salan Y.D.C. Effect of length of premature rupture of membranes period toward apgar score of the infant and maternal leukocyte serum in Ulin General Hospital Banjarmasin. *Berkala Kedokteran*, 2017, vol. 13, no. 2, pp. 199–204. doi: 10.20527/jbk.v13i2.4076
36. Shah B.A., Padbury J.F., Anderson M.P., Holick M.F., Szyld E., Gordon C.M. Vitamin D and associated perinatal-neonatal outcomes among extremely low-birth-weight infants. *J. Perinatol.*, 2018, vol. 38, no. 10, pp. 1318–1323. doi: 10.1038/s41372-018-0203-y
37. Silveira M.L., Caminha N.D.O., Sousa R.D., Pessoa S., Gurgel E., Cavalcante D. Neonatal outcome in pregnancies that presented premature rupture of membranes. *Rev. Rene*, 2014, vol. 15, no. 3, pp. 491–498. doi: 10.15253/2175-6783.2014000300014
38. Stock O., Gordon L., Kapoor J., Walker S.P., Whitehead C., Kaitu'u-Lino T.J., Pell G., Hannan N.J., Tong S. Chorioamnionitis occurring in women with preterm rupture of the fetal membranes is associated with a dynamic increase in mRNAs coding cytokines in the maternal circulation. *Reprod. Sci.*, 2015, vol. 22, no. 7, pp. 852–859. doi: 10.1177/1933719114565034
39. Terek D., Özcan G., Ergin F., Köroğlu Ö.A., Yalaz M., Akisu M., Kultursay N. Vitamin D deficiency in premature infants and its effects on neonatal prognosis. *J. Pediatr. Res.*, 2018, vol. 5, no. 1, pp. 37–40. doi: 10.4274/jpr.82788

40. Thorp J.M., Camargo C.A., McGee P.L., Harper M., Klebanoff M.A., Sorokin Y., Varner M.W., Wapner R.J., Caritis S.N., Iams J.D., Carpenter M.W., Peaceman A.M., Mercer B.M., Sciscione A., Rouse D.J., Ramin S.M., Anderson G.B.; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. Vitamin D status and recurrent preterm birth: a nested case-control study in high-risk women. *BJOG*, 2012, vol. 119, no. 13, pp. 1617–1623. doi: 10.1111/j.1471-0528.2012.03495.x
41. Thota C., Menon R., Fortunato S.J., Brou L., Lee J.E., Al-Hendy A. 1,25-Dihydroxyvitamin D deficiency is associated with preterm birth in African American and Caucasian women. *Reprod. Sci.*, 2014, vol. 21, no. 2, pp. 244–250. doi: 10.1177/1933719113493513
42. Yang L., Pan S., Zhou Y., Wang X., Qin A., Huang Y., Sun S. The correlation between serum vitamin D deficiency and preterm. *Birth. Med Sci Monit.*, 2016, vol. 22, pp. 4401–4405. doi: 10.12659/msm.898117
43. Zeng L.N., Zhang L.L., Shi J., Gu L.L., Grogan W., Gargano M.M., Chen C. The primary microbial pathogens associated with premature rupture of the membranes in China: a systematic review. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.*, 2014, vol. 53, no. 4, pp. 443–451. doi: 10.1016/j.tjog.2014.02.003
44. Zhang Q., Chen H., Wang Y., Zhang C., Tang Z., Li H., Huang X., Ouyang F., Huang H., Liu Z. Severe vitamin D deficiency in the first trimester is associated with placental inflammation in high-risk singleton pregnancy. *Clin. Nutr.*, 2019, vol. 38, no. 4, pp. 1921–1926. doi: 10.1016/j.clnu.2018.06.978
45. Zhou S.S., Tao Y.H., Huang K., Zhu B.B., Tao F.B. Vitamin D and risk of preterm birth: up-to-date meta-analysis of randomized controlled trials and observational studies. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2017, vol. 43, no. 2, pp. 247–256. doi: 10.1111/jog.13239

Авторы:

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

Рахшанизаде Ф., ассистент кафедры педиатрии, факультет 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;

Rakhshanizadeh F., Assistant Professor of Pediatrics, Department of Pediatrics, Faculty 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 01.09.2021
Отправлена на доработку 08.12.2021
Принята к печати 06.04.2022

Received 01.09.2021
Revision received 08.12.2021
Accepted 06.04.2022

ФАКТОРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ COVID-19

О.Н. Колотова, Л.В. Катаева, И.В. Бакштановская, К.Б. Степанова,
Т.Ф. Степанова

ФБУН Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Тюмень, Россия

Резюме. Штаммы бактерий *K. pneumoniae*, обладающие множественной лекарственной устойчивостью, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра или карбапенемазы, представляют собой серьезную клиническую угрозу. Целью проведения исследования было определение факторов резистентности штаммов *K. pneumoniae*, изолированных из нижних дыхательных путей пациентов с диагнозом «внебольничная пневмония» в период пандемии COVID-19. **Материалы и методы.** В исследование резистентности к антимикробным препаратам включены 138 штаммов *K. pneumoniae*, изолированных из мокроты пациентов, находящихся на лечении в инфекционных моногоспиталях г. Тюмени и Тюменской области, в период с мая 2020 г. по июнь 2021 г. Среди исследованных штаммов 51,4% изолированы от пациентов с положительным результатом SARS-CoV-2. Определение наличия генов резистентности методом ПЦР проведено на 71 штамме *K. pneumoniae* (34 штамма от ковидпозитивных и 37 штаммов от ковиднегативных пациентов). Идентификацию выделенных штаммов бактерий осуществляли по белковым спектрам с помощью настольного времяпролетного масс-спектрометра с матричной лазерной десорбцией MALDI-ToF MS (Bruker, Германия). Принадлежность штаммов к гипермукоидному фенотипу определяли при помощи string-теста. Чувствительность к антимикробным препаратам выполняли диско-диффузионным методом на среде Мюллера–Хинтон. Определение чувствительности штаммов культур к препаратам бактериофагов проводили капельным методом (spot-test). В исследовании использовали «Секстафаг пиобактериофаг поливалентный» и «Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный» (АО «НПО «Микроген», Россия). Обнаружение генов резистентности к бета-лактамам антибиотикам методом ПЦР в режиме реального времени осуществляли набором «БакРезиста» (ООО «ДНК-Технология», Россия). **Результаты** исследования свидетельствуют о том, что бактерии *K. pneumoniae*, изолированные от ковидпозитивных и ковиднегативных пациентов с диагнозом «внебольничная пневмония», обладали высокой резистентностью к антимикробным препаратам и коммерческим фагосодержащим лекарственным препаратам. Резистентность штаммов *K. pneumoniae* регистрировалась от 50% (к аминогликозидам и карбапенемам) до 90% (к ингибитор-защищенным пенициллинам). Чувствительность к бактериофагам отмечалась в среднем не более чем у 20% штаммов. Важно подчеркнуть, что штаммы, изолированные от ковидпозитивных пациентов, чаще проявляли гипермукоидный фенотип, предполагающий высокую вирулентность бактерий, а также отличались большей резистентностью ко всем взятым в исследование группам антибактериальных препаратов, что подтверждается наличием генов резистентности группы ESBL и карба-

Адрес для переписки:

Колотова Ольга Николаевна
625026, Россия, г. Тюмень, ул. Республики, 147,
ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (3452) 28-99-94, 8 904 461-24-65.
E-mail: Vakarinaaa@tniikip.rosпотребнадzor.ru

Contacts:

Olga N. Kolotova
625026, Russian Federation, Tyumen, Republic str., 147,
Tyumen Region Infection Pathology Research Institute.
Phone: +7 (3452) 28-99-94, +7 904 461-24-65.
E-mail: Vakarinaaa@tniikip.rosпотребнадzor.ru

Для цитирования:

Колотова О.Н., Катаева Л.В., Бакштановская И.В., Степанова К.Б.,
Степанова Т.Ф. Факторы резистентности бактерий *Klebsiella pneumoniae* в период пандемии COVID-19 // Инфекция и иммунитет.
2022. Т. 12, № 3. С. 563–568. doi: 10.15789/2220-7619-RFO-1837

Citation:

Kolotova O.N., Kataeva L.V., Bakshtanovskaya I.V., Stepanova K.B.,
Stepanova T.F. Resistance factors of *Klebsiella pneumoniae* bacteria during
COVID-19 pandemic // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 563–568. doi: 10.15789/
2220-7619-RFO-1837

пенемаз. Полученные результаты позволяют предположить, что высокий уровень резистентности штаммов *K. pneumoniae*, изолированных от ковидпозитивных пациентов, связан с иммунодепрессией, спровоцированной вирусом SARS-CoV-2, что способствует колонизации их более вирулентными штаммами.

Ключевые слова: пневмония, COVID-19, *Klebsiella pneumoniae*, факторы резистентности, чувствительность к антимикробным препаратам, бета-лактамазы.

RESISTANCE FACTORS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* BACTERIA DURING COVID-19 PANDEMIC

Kolotova O.N., Kataeva L.V., Bakshantovskaya I.V., Stepanova K.B., Stepanova T.F.

Tyumen Region Infection Pathology Research Institute. Tyumen, Russian Federation

Abstract. Multidrug-resistant *K. pneumoniae* bacterial strains producing extended range of beta-lactamases or carbapenemases are of serious clinical concern. The aim of the study was to determine the resistance factors of *K. pneumoniae* strains isolated from the lower respiratory tract of patients diagnosed with community-acquired pneumonia during the COVID-19 pandemic. **Materials and methods.** The study of resistance to antimicrobial drugs included 138 strains of *K. pneumoniae* isolated from the sputum of patients treated in infectious diseases monohospitals in the city of Tyumen and the Tyumen region within the period from May 2020 to June 2021. Among the strains examined, 51.4% of them were isolated from SARS-CoV-2 positive patients. The presence of resistance genes was determined by PCR in 71 strains of *K. pneumoniae* (34 strains from COVID-19-positive and 37 strains from COVID-19-negative patients). Identification of isolated bacterial strains was carried out according to the protein spectra by using a desktop time-of-flight mass spectrometer with matrix laser desorption MALDI-TOF MS (Bruker, Germany). The belonging of the strains to the hypermucoid phenotype was determined using the string test. Sensitivity to antimicrobial drugs was assessed in the disk diffusion method on Muller–Hinton medium. The sensitivity of culture strains to bacteriophage preparations was determined by the drop method (spot-test). In the study, we used “Polyvalent Sextaphage Pyobacteriophage” and “Purified Polyvalent Klebsiella Bacteriophage” (JSC NPO Microgen, Russia). Detection of resistance genes to beta-lactam antibiotics by real-time PCR was carried out using the BakRezista kit (OOO DNA-technology, Russia). **Results.** The results of the study evidence that *K. pneumoniae* bacteria isolated from COVID-19-positive and COVID-19-negative patients diagnosed with community-acquired pneumonia displayed a high resistance to antimicrobial drugs and commercial phage-containing drugs. Resistance of *K. pneumoniae* strains was recorded from 50% (to aminoglycosides and carbapenems) to 90% (to inhibitor-protected penicillins). Sensitivity to bacteriophages was noted on average in no more than 20% of strains. It is important to emphasize that strains isolated from COVID-19-positive patients more often showed a hypermucoid phenotype, suggesting a high bacterial virulence, and also showed greater resistance to all groups of antibacterial drugs examined in the study, which is confirmed by the presence of resistance genes of the ESBL group and carbapenemase. The results of the study suggest that the high level of resistance of *K. pneumoniae* strains isolated from COVID-19-positive patients is associated with immunosuppression provoked by the SARS-CoV-2 virus, which contributes to their colonization by more virulent strains.

Key words: pneumonia, COVID-19, *Klebsiella pneumoniae*, resistance factors, antimicrobial sensitivity, beta-lactamase.

Введение

Пандемия новой коронавирусной инфекции сопровождается высоким уровнем заболеваемости внебольничной пневмонией (ВП), вызванной ассоциацией возбудителей с высокой долей осложненных и затяжных случаев [1]. Разрушение иммунных клеток вирусом SARS-CoV-2 делает пациентов уязвимыми к вторичным бактериальным инфекциям. Независимым фактором риска неблагоприятного исхода пневмонии является выделение из биоматериала возбудителей с множественной антимикробной устойчивостью — ESKAPE-патогенов [3, 5, 15]. В настоящее время наблюдается рост числа случаев ВП, обусловленной представителями условно-патогенных бактерий, в частности *K. pneumoniae* [2, 13].

Наличие капсулы у штаммов *K. pneumoniae*, обеспечивает способность бактерий ускользать от иммунного ответа организма, включая за-

щиту от фагоцитоза, катионных антимикробных пептидов, системы комплемента [8, 11]. Гиперпродукция капсульных полисахаридов значительно повышает вирулентность бактерий. Инфекции, вызванные гипермукоидными штаммами, считаются особо тяжелыми и могут приводить к летальному исходу [10, 12, 14]. Еще одним фактором вирулентности является выработка ферментов бета-лактамаз. Бета-лактамазы содержат в своей структуре циклическую амидную связь и способны расщеплять пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы. По механизму действия все бета-лактамазы делятся на сериновые (классы А, С, D) и металло-бета-лактамазы (класс В) [9, 10]. К бета-лактамазам класса А расширенного спектра действия относятся TEM, SHV, CTX. Характерные для *K. pneumoniae* карбапенемазы относятся к сериновым бета-лактамазам: молекулярный класс А (KPC), D (OXA-48) и к металло-бета-лактамазам

класса В (NDM, VIM, IMP) [4, 6]. Наличие карбапенемаз у штаммов бактерий в настоящее время считается серьезной проблемой и является важным маркером экстремальной антибиотикорезистентности, поскольку ассоциируется с устойчивостью к большинству не бета-лактамовых препаратов [4, 6, 7].

Целью данного исследования было определение факторов резистентности штаммов *K. pneumoniae*, изолированных из нижних дыхательных путей пациентов с диагнозом «внебольничная пневмония» в период пандемии COVID-19.

Материалы и методы

Проанализировано 2046 проб содержимого нижних дыхательных путей от пациентов, находящихся на амбулаторном и стационарном лечении в моногоспиталях г. Тюмени, с подтвержденным диагнозом ВП. Средний возраст пациентов составил 60 лет. Клинический материал получен в период с мая 2020 г. по июнь 2021 г.

Отбор и транспортировка биологического материала для лабораторного исследования проводились в соответствии с СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Бактериологическое исследование мокроты проведено в соответствии с МР 4.2.0114-16 «Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии». Идентификация выделенных штаммов бактерий выполнялась с помощью настольного время-пролетного масс-спектрометра с матричной лазерной десорбцией MALDI-ToF MS (Bruker, Германия) по белковым спектрам и оценивалась по высоким показателям достоверности (score более 2).

Исследование фенотипа бактерий, чувствительности к бактериофагам и антимикробным препаратам (АМП) проведено на 138 штаммах *K. pneumoniae*, изолированных из мокроты пациентов с диагнозом ВП.

Гипермукоидный фенотип штаммов определяли при постановке string-теста. Если при снятии колонии, выращенной на 5% кровяном агаре, за бактериологической петлей образовывался «тяж» высотой более 5 мм от поверхности питательной среды, тест считали положительным.

Бактериальную суспензию для оценки резистентности к антимикробным препаратам и препаратам бактериофагов готовили по стандартной методике с оптической плотностью 0,5 по МакФарланду. Резистентность к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом на среде Мюллера–Хинтон (HiMedia, Индия), результаты анализировали в соответствии с действующими нормативны-

ми документами (Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», версия-2018-03, и МУК 4.2.1890-04). В исследование взяты диски с амоксициллин-клавулановой кислотой, ципрофлоксацином, амикацином, цефтазидимом, цефотаксимом, имипенемом, меропенемом производства ООО «НИЦФ», Россия. Определение чувствительности штаммов культур к препаратам бактериофагов проводили капельным методом (spot-test), для этого использовали «Секстафаг пиобактериофаг поливалентный», «Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный» (АО «НПО «Микроген», Россия). Литическую активность фага оценивали по количеству «крестов», «+++» и «++++» принимали за высокую чувствительность штаммов к исследуемым бактериофагам.

Определение наличия генов резистентности методом ПЦР проведено на 71 штамме *K. pneumoniae* (34 штамма от ковидпозитивных и 37 штаммов от ковиднегативных пациентов). ДНК из суточной культуры бактерий выделяли с помощью набора «Проба-НК/50» (ООО «ДНК-Технология», Россия). Обнаружение генов резистентности молекулярных классов А, В, D к бета-лактамам антибиотикам методом ПЦР в режиме реального времени осуществляли набором «БакРезиста», ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия).

Все пробы отделяемого нижних дыхательных путей исследованы методом ПЦР на наличие вируса SARS-CoV-2. Для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 использовали тест-системы «Вектор-ПЦРrv-2019-nCoV-RG» (ГНЦ «Вектор», Россия), «SARS-CoV-2/SARS-CoV» («ДНК-технология», Россия).

Результаты и обсуждение

Бактериологическое исследование отделяемого нижних дыхательных путей показало, что бактерии *K. pneumoniae* выделяются в 5,9% у ковидпозитивных пациентов и в 10,4% случаев у ковиднегативных. Практически все изоляты *K. pneumoniae* находились в ассоциациях с другими бактериями, такими как грибы рода *Candida*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*. В чистой культуре штаммы *K. pneumoniae* у ковидпозитивных пациентов изолированы в 0,8%, у ковиднегативных — 2,3% случаев.

Колонии исследуемых бактерий *K. pneumoniae* на среде Эндо определены как блестящие, выпуклые, слизистые, с ровным краем. На кровяном агаре колонии средних размеров, слизистые, с ровным краем, зону гемолиза не образовывали. Все штаммы разлагали глюкозу, сахарозу, маннит, цитрат, не обладали подвижно-

стью. На основании string-теста выявлено 13,8% изолятов с гипермукоидным фенотипом, при этом 80% из них были выделены от ковидпозитивных пациентов.

При определении чувствительности к препаратам бактериофагов показано, что «Секстафаг пиобактериофаг поливалентный» обладает лучшей литической активностью в отношении исследуемых культур *K. pneumoniae* в сравнении с препаратом «Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный». Так, 20,6% штаммов проявляли чувствительность к «Секстафагу пиобактериофагу поливалентному» и только 5,9% были чувствительны к «Бактериофагу клебсиелл поливалентному очищенному».

Исследование чувствительности к АМП диско-диффузионным методом штаммов *K. pneumoniae*, изолированных от ковидпозитивных пациентов, выявило резистентность к ингибитор-защищенным пеницилинам (амоксциллин/клавулановая кислота) более чем в 90% случаев; резистентность к фторхинолонам (ципрофлоксацин), цефалоспорином III поколения (цефотаксим, цефтазидим) составила более 80%. Резистентность их к аминогликозидам (амикацин) и карбапенемам (имипенем, меропенем) выявлена у половины штаммов. Штаммы *K. pneumoniae*, изолированные от ковиднегативных пациентов, обладали резистентностью ко всем перечисленным группам АМП. Она составила в среднем от 50 до 70% (рис.).

Сравнительная характеристика по частоте обнаружения и уровню резистентности бактерий *K. pneumoniae*, изолированных от ковидпозитивных и ковиднегативных пациентов свидетельствует о том, что ковидпозитивные пациен-

ты контаминированы ими почти в 2 раза реже, но резистентность их в 1,3 раза выше.

Молекулярно-генетическими методами показано, что 94,1% исследованных штаммов, изолированных от ковидпозитивных и 89,2% — от ковиднегативных пациентов, являются продуцентами бета-лактамаз расширенного спектра действия класса А. Из них ведущее место занимают гены резистентности SHV и TEM. Вместе с тем 32,3% изолятов ковидпозитивных пациентов и 35,1% штаммов ковиднегативных пациентов обладали тремя генами бета-лактамаз класса А (SHV, TEM, CTX-M-1). При этом наличие ESBL, выявленных диско-диффузионным методом, в среднем составило 10%. Обнаружено несколько типов карбапенемаз: Нью-Дели металло-бета-лактамазы (NDM) и оксациллиназы (OXA-48, OXA-51, OXA-23, OXA-40). У штаммов, выделенных от ковиднегативных пациентов, гены OXA-48 определялись в 2 раза чаще. Гены резистентности *Klebsiella pneumoniae* карбапенемаза (KPC) выявлялись в 1,4 раза чаще у ковиднегативных пациентов, что составило 89,2% (табл.).

Из 10 штаммов, изолированных от ковидпозитивных, и 5 штаммов ковиднегативных пациентов, чувствительных к АМП и обладающих гипермукоидным типом, методом ПЦР выявлены образцы, несущие гены ESBL: SHV, TEM, CTX-M, карбапенемазы KPC и оксациллиназы OXA-48.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что бактерии *K. pneumoniae*, изолированные от ковидпозитивных и ковиднегативных пациентов с внебольничной пневмонией, обладали высокой резистентностью к АМП и коммерческим фагосодержащим лекарственным препаратам. Резистентность

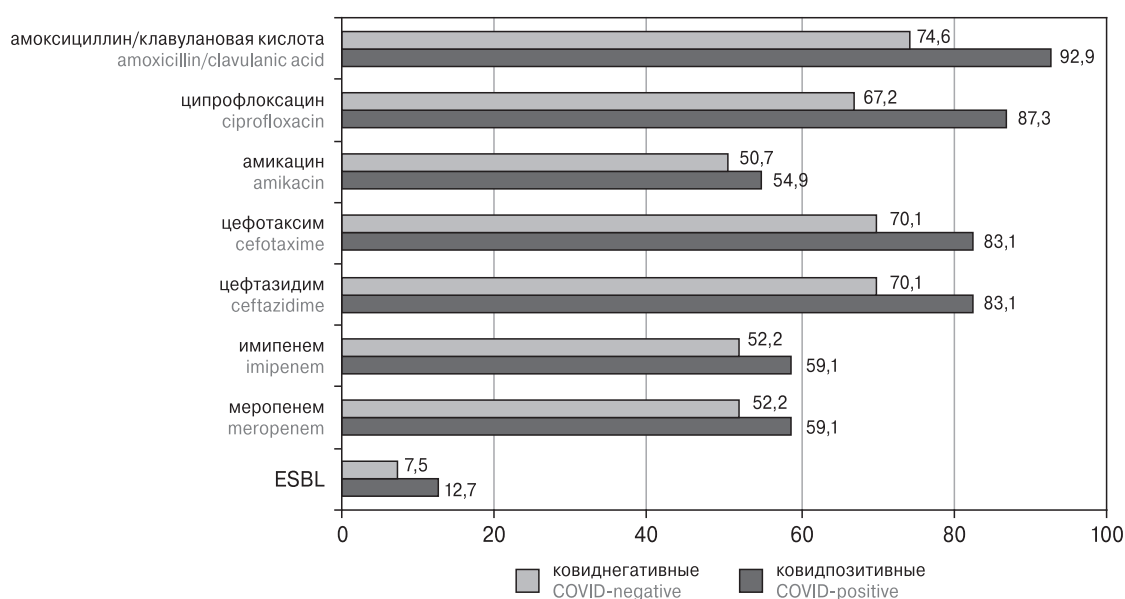


Рисунок. Резистентность штаммов *K. pneumoniae* к антибиотикам (%)

Figure. Antibiotic resistance of *K. pneumoniae* strains (%)

Таблица. Распределение генов бета-лактамаз штаммов *K. pneumoniae*, изолированных из мокроты пациентов с диагнозом «внебольничная пневмония»Table. Distribution of beta-lactamase genes in *K. pneumoniae* strains isolated from sputum of patients diagnosed with community-acquired pneumonia

Бета-лактамазы Beta-lactamase			Штаммы <i>K. pneumoniae</i> (n = 71) <i>K. pneumoniae</i> strains				
			Ковидпозитивные COVID-positive (n = 34)		Ковиднегативные COVID-negative (n = 37)		
			абс. abs.	%	абс. abs.	%	
Сериновые Serine	Класс Class	A	CTX-M-1	13	38,2	16	43,2
			TEM	23	67,6	26	70,3
			SHV	32	94,1	33	89,2
			KPC	22	64,7	33	89,2
	D	OXA-40	0	0	1	2,7	
		OXA-51-like	3	8,8	1	2,7	
		OXA-23-like	1	2,9	2	5,4	
		OXA-48-like	5	14,7	11	29,7	
Металло-бета-лактамазы Metal-beta-lactamase	B	NDM	4	11,7	1	2,7	

штаммов *K. pneumoniae* регистрировалась от 50% (к аминогликозидам и карбапенемам) до 90% (к ингибитор-защищенным пенициллинам). Чувствительность к бактериофагам отмечалась не более чем у 20% штаммов. Важно подчеркнуть, что штаммы, изолированные от ковидпозитивных пациентов, чаще проявляли гипермукоидный фенотип, предполагающий высокую вирулентность бактерий, а также отличались

большой резистентностью ко всем взятым в исследование группам АМП, что подтверждается наличием генов резистентности группы ESBL и карбапенемаз. Полученные результаты исследования позволяют предположить, что высокий уровень резистентности штаммов *K. pneumoniae*, изолированных от ковидпозитивных пациентов, связан с иммунодепрессией, спровоцированной вирусом SARS-CoV-2.

Список литературы/References

- Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Шипулина О.Ю., Яцышина С.Б., Тиванова Е.В., Каленская А.В., Соловьева И.В., Вершинина М.А., Квасова О.А., Плоскирева А.А., Мамошина М.В., Елькина М.А., Андреева Е.Е., Иваненко А.В., Михайлова О.М. Эпидемиологическое значение определения РНК SARS-CoV-2 среди различных групп населения Москвы и Московской области в период эпидемии COVID-19 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020. Т. 97, № 3. С. 197–201. [Akimkin V.G., Kuzin S.N., Shipulina O.Yu., Yatsyshina S.B., Tivanova E.V., Kalenskaya A.V., Solovieva I.V., Verшинina M.A., Kvasova O.A., Ploskireva A.A., Mamoshina M.V., Elkina M.A., Andreeva E.E., Ivanenko A.V., Mikhailova O.M. Epidemiological significance of detection of SARS-CoV-2 RNA among different groups of population of Moscow and Moscow Region during the COVID-19 outbreak. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2020, vol. 97, no. 3, pp. 197–201. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-3-1
- Гордінская Н.А., Бруснигина Н.Ф., Алексеева А.Е., Солнцева Л.А., Савочкина Ю.А., Сабирова Е.В., Абрамова Н.В., Карасева Г.Н. Молекулярная характеристика антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в травматологических стационарах // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017. Т. 19, № 3. С. 243–246. [Gordinskaya N.A., Brusnigina N.F., Alekseeva A.E., Solntzev L.A., Savochkina Yu.A., Sabirova E.V., Abramova N.V., Karaseva G.N. Molecular characteristics of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in trauma hospitals. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, vol. 19, no. 3, pp. 243–246. (In Russ.)]
- Зайцев А.А., Синопальников А.И. «Трудная» пневмония // Терапевтический архив. 2021. Т. 93, № 3. С. 300–310. [Zaicev A.A., Sinopalnikov A.I. “Difficult” pneumonia. *Terapevticheskii arkhiv = Terapevticheskiy Arkhiv*, 2021, vol. 93, no. 3, pp. 300–310. (In Russ.)] doi: 10.26442/00403660.2021.03.200734
- Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном стационаре // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 79–84. [Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P. Susceptibility to antibiotics in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a multidisciplinary medical centre. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 79–84. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-79-84
- Лакхин Р.Е., Жирнова Е.А., Грачев И.Н. Внебольничная и нозокомиальная пневмония: семиотика поражения легких, микробиологический спектр и чувствительность возбудителей к антибиотикам // Военно-медицинский журнал. 2019. № 4. С. 35–41. [Lakhin R.E., Zhirnova E.A., Grachev I.N. Community-acquired and nosocomial pneumonia: semiotics of lung damage, microbiological spectrum and sensitivity of pathogens to antibiotics. *Voенно-meditsinskiy zhurnal = Military Medical Journal*, 2019, no. 4, pp. 35–41. (In Russ.)]

6. Первухин С.А., Стаценко И.А., Иванова Е.Ю., Пальмаш А.В., Витковская И.В., Жидкова О.В. Антибиотико-резистентность грамотрицательных возбудителей нозокомиальной пневмонии у пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019. Т. 21, № 1. С. 62–68. [Pervukhin S.A., Statzenko I.A., Ivanova E.Yu., Palmash A.V., Vitkovskaya I.V., Zhidkova O.V. Antimicrobial resistance of Gram-negative pathogens of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* = *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2019, vol. 21, no. 1, pp. 62–68. (In Russ.)] doi: 10.36488/cmac.2019.1.62-68
7. Скачкова Т.С., Шипулина О.Ю., Шипулин Г.А., Шеленков А.А., Янушевич Ю.Г., Михайлова Ю.В., Замятин М.Н., Гусаров В.Г., Петрова Н.В., Лашенкова Н.Н., Фомина В.С., Шагин Д.А. Изучение генетического разнообразия штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном медицинском центре г. Москвы, с помощью секвенирования нового поколения // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019. Т. 21, № 1. С. 69–74. [Skachkova T.S., Shipulina O.Yu., Shipulin G.A., Shelenkov A.A., Yanushevich Yu.G., Mikhaylova Yu.V., Zamyatin M.N., Gusarov V.G., Petrova N.V., Lashenkova N.N., Fomina V.S., Shagin D.A. Characterization of genetic diversity of the *Klebsiella pneumoniae* strains in a Moscow tertiary care center using next-generation sequencing. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* = *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2019, vol. 21, no. 1, pp. 69–74. (In Russ.)] doi: 10.36488/cmac.2019.1.69-74
8. Фесенко О.В., Швайко С.Н. Пневмонии, вызванные *Klebsiella pneumoniae* (фридлендеровские пневмонии) // Практическая пульмонология. 2019. № 1. С. 22–31. [Fesenko O.V., Shvaiko S.N. Pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* (Friedlander's pneumonia). *Prakticheskaya pul'monologiya* = *Practical pulmonology*, 2019, no. 1, pp. 22–31. (In Russ.)]
9. Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Ризванов А.А., Давидюк Ю.Н., Халиуллина С.В., Любин С.А., Казакова Ф.М., Сатрутдинов М.А., Фатоват М.Г. Вирулентность и антибиотикорезистентность изолятов *Klebsiella pneumoniae* у новорожденных с локализованными и генерализованными формами клебсиеллезной инфекции // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2018. Т. 63, № 5. С. 139–146. [Khaertynov Kh.S., Anohin V.A., Rizvanov A.A., Davidyuk Yu.N., Khaliullina S.V., Lyubin S.A., Kazakova F.M., Satrutdinov M.A., Fattahov M.G. Virulence and antibiotic resistance of isolates of *Klebsiella pneumoniae* in newborns with localized and generalized forms of infection. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii* = *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2018, vol. 63, no. 5, pp. 140–146. (In Russ.)] doi: 10.21508/1027-4065-2018-63-5-140-146
10. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Подопривога И.В., Шагин Д.А. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020. Т. 22, № 1. С. 4–19. [Chebotar I.V., Bocharova Yu.A., Podoprivoga I.V., Shagin D.A. The reasons why *Klebsiella pneumoniae* becomes a leading opportunistic pathogen. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* = *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2020, vol. 22, no. 1, pp. 4–19. (In Russ.)] doi: 10.36488/cmac.2020.1.4-19
11. Hasani A., Soltani E., Ahangarzadeh Rezaee M., Pirzadeh T., Ahangar Oskouee M., Hasani A., Gholizadeh P., Noie Oskouee A., Binesh E. Serotyping of *Klebsiella pneumoniae* and its relation with capsule-associated virulence genes, antimicrobial resistance pattern, and clinical infections: a descriptive study in medical practice. *Infect. Drug Resist.*, 2020, no. 13, pp. 1971–1980. doi: 10.2147/IDR.S243984
12. Liu C., Guo J. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2019, vol. 18, no. 4. doi: 10.1186/s12941-018-0302-9
13. Martin R.M., Bachman M.A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2018, vol. 8, no. 4. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004
14. Su K., Zhou X., Luo M., Xu X., Liu P., Li X., Xue J., Chen S., Xu W., Li Y., Qiu J. Genome-wide identification of genes regulated by RcsA, RcsB, and RcsAB phosphorelay regulators in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-2044. *Microb. Pathog.*, 2018, no. 123, pp. 36–41. doi: 10.1016/j.micpath.2018.06.036
15. Tay M.Z., Poh C.M., Renia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, vol. 20, pp. 363–374. doi: 10.1038/s41577-020-0311-8

Авторы:

Колотова О.Н., младший научный сотрудник бактериологической лаборатории ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Катаева Л.В., к.м.н., ведущий научный сотрудник, зав. бактериологической лабораторией ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Бакштановская И.В., к.б.н., ученый секретарь ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Степанова Т.Ф., д.м.н., профессор, директор ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Степанова К.Б., к.м.н., ведущий научный сотрудник клинической лаборатории ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия.

Authors:

Kolotova O.N., Junior Researcher, Bacteriological Laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Kataeva L.V., PhD (Medicine), Leading Researcher, Head of the Bacteriological Laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Bakshtanovskaya I.V., PhD (Biology), Scientific Secretary, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Stepanova T.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Stepanova K.B., PhD (Medicine), Leading Researcher, Clinical Laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation.

Поступила в редакцию 02.12.2021
Отправлена на доработку 19.02.2022
Принята к печати 04.04.2022

Received 02.12.2021
Отправлена на доработку 19.02.2022
Accepted 04.04.2022

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ COVID-19 У ОДНОЯЙЦЕВЫХ БЛИЗНЕЦОВ

С.М. Юдина, В.В. Киселева, Т.С. Русанова, И.А. Иванова

ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Курск, Россия

Резюме. На протяжении двух лет проблема клинического течения и принципов лечения новой коронавирусной инфекции COVID-19 остается самой обсуждаемой. Вместе с тем достоверных прогностических критериев, определяющих особенности течения и исход заболевания, не установлено. В связи с этим представляют интерес приводимые в данной статье клинические случаи COVID-19 у однояйцевых близнецов. Пациенты А. и С., 39 лет, поступили в областную клиническую инфекционную больницу, где им был поставлен диагноз: «Коронавирусная инфекция COVID-19 подтвержденная, среднетяжелая форма. Двусторонняя полисегментарная пневмония средней степени тяжести, ДН I степени». Несмотря на одинаковые данные анамнеза, течение коронавирусной инфекции COVID-19 у однояйцевых близнецов существенно различалось. У пациента А. в крови отмечался лимфоцитоз, незначительное ускорение СОЭ, повышение СРБ, ферритина, IL-6, D-димера. У его брата-близнеца (пациент С.) отмечалась лимфопения, ускорение СОЭ до 20 мм/ч, значительное увеличение СРБ до 10 мг/мл, IL-6 — до 9,5 пг/мл, D-димера — до 750 нг/мл. Состояние больного А. оставалось стабильным, на 13-й день лечения он был выписан из стационара. У больного С. на 3-й день отмечалось резкое ухудшение состояния. Учитывая снижение уровня SpO₂ до 88% и поражение паренхимы легких более 70%, пациенту были назначены антибактериальные препараты, препарат моноклональных антител к IL-6, селективный обратимый ингибитор Янус-киназы 1 и 2. В течение следующих двух дней отмечалась положительная динамика состояния больного, на 19-й день пребывания в стационаре он был выписан для проведения реабилитации. Таким образом, существенные различия в тяжести течения новой коронавирусной инфекции у однояйцевых близнецов с одинаковым анамнезом, отсутствием отягощающих коморбидных состояний, вероятнее всего, обусловлены начальной дозой вирусной нагрузки, явившейся важным фактором, определяющим развитие и течение инфекции.

Ключевые слова: COVID-19, однояйцевые близнецы, клинический случай, особенности течения, лечение COVID-19, моноклональные антитела.

FEATURES OF THE NEW CORONAVIRUS COVID-19 INFECTION IN IDENTICAL TWINS

Yudina S.M., Kiseleva V.V., Rusanova T.S., Ivanova I.A.

Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russian Federation

Abstract. The problem of the clinical course and principles of treatment for the new coronavirus infection COVID-19 remains the most debated issue. At the same time, reliable prognostic criteria that determine characteristics of the dis-

Адрес для переписки:

Русанова Татьяна Сергеевна
305041, Россия, г. Курск, ул. Карла Маркса, 3,
ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский
университет Минздрава РФ.
Тел.: 8 905 041-03-95.
E-mail: rusanova.tatiana046@mail.ru

Contacts:

Tatyana S. Rusanova
305041, Russian Federation, Kursk, Karl Marx str., 3,
Kursk State Medical University of the Ministry of Health
of the Russian Federation.
Phone: +7 905 041-03-95.
E-mail: rusanova.tatiana046@mail.ru

Для цитирования:

Юдина С.М., Киселева В.В., Русанова Т.С., Иванова И.А. Особенности течения новой коронавирусной инфекции COVID-19 у однояйцевых близнецов // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 569–574.
doi: 10.15789/2220-7619-FOT-1868

Citation:

Yudina S.M., Kiseleva V.V., Rusanova T.S., Ivanova I.A. Features of the new coronavirus COVID-19 infection in identical twins // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 569–574.
doi: 10.15789/2220-7619-FOT-1868

ease course and outcome have not been established. Taking it into consideration, we present clinical cases of COVID-19 in identical twins. Patients A. and S., 39 years old, were admitted to the Regional Clinical Infectious Diseases Hospital. The patients were clinically diagnosed with COVID-19 coronavirus infection, verified, moderate form; bilateral polysegmental pneumonia of moderate severity, 1st degree respiratory failure. The course of COVID-19 coronavirus infection in identical twins markedly differed. Patient A. had peripheral blood lymphocytosis, slightly increased ESR, CRP, ferritin, IL-6, and D-dimer level. A paired twin brother (patient S.) had lymphopenia, ESR accelerated up to 20 mm/h, CRP pronouncedly increased up to 10 mg/ml, IL-6 — up to 9,5 pg/ml, and D-dimer — up to 750 ng/ml. Condition of the patient A. remained stable, on day 13th of treatment, the patient was discharged from the hospital. The condition of the patient S. on day 3rd of hospitalization deteriorated sharply. Considering the decrease in SpO₂ level down to 88%, the damage of the lung parenchyma was more than 70%, resulting in the use of antibacterial drugs, anti-IL-6 monoclonal antibodies as well as selective reversible inhibitor of Janus-kinases 1 and 2. On day 16th of treatment, subjectively, the patient showed an improvement in general condition. During the next two days, the patient's condition revealed marked positive dynamics on day 19th of hospital stay, the patient was discharged for rehabilitation. Thus, significant differences in the severity of the course of the new coronavirus infection in identical twins with similar medical history and lack of confounding comorbidities are most likely due to the initial dose of the viral load which was an important factor determining the development and course of infection.

Key words: COVID-19, identical twins, clinical case, course features, COVID-19 treatment, monoclonal antibodies.

Введение

Новая коронавирусная инфекция COVID-19, возникшая в декабре 2019 г. в Китае, стремительно распространилась по всему миру, и в марте 2020 г. Всемирной организацией здравоохранения было объявлено о начале пандемии [5, 11].

На протяжении двух лет проблема особенностей клинического течения и принципов лечения данной инфекции остается самой обсуждаемой. Клиника коронавирусной инфекции может проявляться бессимптомным носительством, латентным течением, манифестными формами заболевания с поражением легких, сердечно-сосудистой, кровеносной и нервной систем, урогенитального и желудочно-кишечного трактов [3, 12]. Многочисленные исследования механизмов развития COVID-19, проведенные зарубежными и отечественными учеными, внесли существенный вклад в изучение патогенеза и разработку эффективных методов лечения с применением моноклональных антител к цитокинам и их рецепторам, ингибиторов Янус-киназ, плазмы реконвалесценто́в и др. [10, 13]. Вместе с тем достоверных прогностических критериев, определяющих особенности течения и исход заболевания, не установлено [6, 15]. К факторам риска неблагоприятного течения относят пожилой возраст, сопутствующую патологию сердечно-сосудистой и дыхательной систем, сахарный диабет, избыточную массу тела [10, 13]. Также выявлены лабораторные критерии тяжелого течения COVID-19, к которым относят лимфопению, значительное увеличение СРБ, ферритина, интерлейкина-6 (IL-6), фактора некроза опухоли (TNF α), D-димера, трансаминаз и др. [8, 13]. Одним из факторов неблагоприятного течения коронавирусной инфекции является не-

контролируемая активация иммунной системы с высвобождением огромного количества цитокинов («цитокиновый шторм») [2, 4]. Научный и практический интерес представляют также особенности клинического течения новой коронавирусной инфекции у пациентов с редкой коморбидной патологией (генетическими заболеваниями, трансплантацией органов и тканей в анамнезе, паранеопластическими процессами) [1, 15]. В связи с этим представляет интерес течение COVID-19 у однояйцевых близнецов.

Материалы и методы

Пациенты А. и С., 39 лет, однояйцевые близнецы, находились на стационарном лечении в Областной инфекционной клинической больнице имени Н.А. Семашко в апреле 2021 г. Больным проводили ежедневное динамическое наблюдение за состоянием с контролем температуры тела, артериального давления, сатурации (SpO₂), аускультативной картины в легких. Комплексное обследование включало общий клинический и биохимический анализы крови, коагулограмму, иммунограмму, электрокардиографию, ультразвуковые методы исследования, компьютерную томографию органов грудной клетки.

Результаты и обсуждение

В статье представлены клинические случаи новой коронавирусной инфекции COVID-19 у однояйцевых близнецов.

Пациенты А. и С., 39 лет, поступили в областную клиническую инфекционную больницу им. Н.А. Семашко с жалобами на повышение температуры до 37,5–37,8°C, сухой кашель, одышку в покое, слабость. Оба пациента заболели одновременно, на четвертый день после

контакта с отцом, у которого была диагностирована коронавирусная инфекция COVID-19, подтвержденная ПЦР-тестом.

При оценке объективного статуса обоих пациентов их общее состояние оценено как среднетяжелое: температура — 37,8°C, вялость, адинамия, кожные покровы и видимые слизистые обычной окраски, сыпи нет, лимфатические узлы не увеличены. Костно-мышечная система без особенностей. Дыхание глубокое, ритмичное, голосовое дрожание ослаблено, перкуторный звук притуплен с обеих сторон, при аускультации на фоне ослабленного дыхания выслушивались влажные мелкопузырчатые хрипы с обеих сторон, число дыхательных движений (ЧДД) — 21 в минуту, сатурация (SpO₂) — 96%, пульс — 90 уд/мин, артериальное давление 130/90 мм рт.ст. Со стороны других органов и систем патологии не выявлено.

При исследовании мазка из зева и носа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) обнаружена РНК SARS-CoV-2. Обоим пациентам был поставлен клинический диагноз: «Коронавирусная инфекция COVID-19 подтвержденная, среднетяжелая форма. Двусторонняя полисегментарная пневмония средней степени тяжести, ДН I степени».

При проведении лабораторного исследования были получены следующие результаты (табл. 1).

Несмотря на схожесть данных анамнеза и клинических проявлений, в лабораторных анализах уже при поступлении были выявлены некоторые различия. У пациента А. в крови отмечался лимфоцитоз до 46%, увеличение СРБ до 5 мг/мл, ферритина до 333 нг/мл, IL-6 до 7,5 пг/мл, D-димера — до 560 нг/мл. В отличие от пациента А., у его брата-близнеца (пациент С.) отмечалась лимфопения до 16%, ускорение СОЭ до 20 мм/ч, значительное увеличение СРБ до 10 мг/мл, IL-6 до 9,5 пг/мл, D-димера — до 750 нг/мл (табл. 2).

При проведении компьютерной томографии (КТ) органов грудной клетки у больного А. в обоих легких определялись округлые участки уплотнения легочной ткани по типу «матового стекла» на фоне неравномерного утолщения внутридолькового интерстиция, ориентировочный объем поражения правого легкого — до 25%, левого — до 20% (КТ-1), визуализировались медиастинальные лимфоузлы до 0,7–1,2 см, в кардиоваскулярной зоне отмечена небольшая дилатация сердца, КТИ до 0,52.

У больного С. при КТ органов грудной клетки в легких также определялись округлые участки уплотнения легочной ткани по типу «матового стекла» на фоне неравномерного утолщения внутридолькового интерстиция, но ориентировочный объем поражения правого легкого доходил до 35%, левого — до 40% (КТ-2),

Таблица 1. Динамика клинических и биохимических показателей крови у больных COVID-19

Table 1. Dynamics of clinical and biochemical blood parameters in patients with COVID-19

Показатели Indicators	Референсные значения Reference meaning	01.04.21		03.04.21		05.04.21		11.04.21		16.04.21
		А.	С.	А.	С.	А.	С.	А.	С.	С.
Лейкоциты, × 10 ⁹ /л Leukocytes, × 10 ⁹ /l	4–9	3,6	3,7	9,1	11,4	7,1	10,5	9	10,8	9,9
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	18–40	46	16	22	14	20	6	35	16	17
Тромбоциты, % Platelets, %	180–320	140	125	210	174	160	166	246	202	216
Моноциты, % Monocytes, %	2–9	3	2	2	3	5	1	5	4	5
СОЭ, мм/ч ESR, mm/h	2–10	12	20	10	30	8	25	10	20	15
Общий белок, г/л Total protein, g/l	60–80	76	73	70	60	65	59	61	56	50
СРБ, мг/мл CRP, mg/ml	0–5	5	10	4	33	4	6	1	4	3
Ферритин, нг/мл Ferritin, ng/ml	20–250	333	179	140	190	11	197	96	122	110
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	0–7	7,5	9,5	2,9	15,4	3,5	9,2	3,7	7,5	6,8

Примечание. А. — пациент со среднетяжелым течением COVID-19, С. — пациент с тяжелым течением COVID-19.

Note. A. — patient with a moderate form of COVID-19, C. — patient with a severe form of COVID-19.

Таблица 2. Динамика показателей коагулограммы у больных COVID-19

Table 2. Dynamics of coagulogram parameters in patients with COVID-19

Показатели Indicators	Референсные значения Reference meaning	01.04.21		03.04.21		05.04.21		12.04.21		16.04.21
		А.	С.	А.	С.	А.	С.	А.	С.	С.
ПТИ, % PTI, %	80–105	95	115	107	90	89	102	97	93	105
МНО, у.е. INR, cu	0,3–1,5	1,05	0,87	0,94	1,1	1,11	1,06	1,03	1,08	0,95
АЧТВ, с APTT, s	24–35	28	23	25	30	26	29	29	30	26
Д-димер, нг/мл D-dimer, ng/ml	0–250	560	700	460	900	300	2680	300	1230	650

Примечание. А. — пациент со среднетяжелым течением COVID-19, С. — пациент с тяжелым течением COVID-19.

Note. A. — patient with a moderate form of COVID-19, C. — patient with a severe form of COVID-19.

визуализировались медиастанальные лимфоузлы до 0,8–1,3 см, патологии в кардиоваскулярной зоне не отмечено.

Таким образом, у пациента С. уже при поступлении, несмотря на среднюю тяжесть состояния, отмечены более выраженные изменения в лабораторных показателях и данных КТ.

Согласно временным методическим рекомендациям по профилактике, диагностике и лечению COVID-19 (версия 10), пациентам была назначена противовирусная (фавипиравир 1800 мг два раза в сутки в первый день, далее по 800 мг 2 раза в сутки) и противовоспалительная терапия (дексаметазон 20 мг по схеме), антикоагулянты (апиксабан 5 мг два раза в сутки).

Состояние больного А. оставалось стабильным, на фоне проводимого лечения уже на четвертый день пребывания в стационаре отмечалась выраженная положительная динамика: уменьшение одышки, кашля, нормализация температуры. Улучшение состояния сочеталось с восстановлением лабораторных показателей до референсных значений. При проведении рентгенологического исследования, по сравнению с предыдущим результатом, отмечена положительная динамика, характеризующаяся уменьшением инфильтрации легочной ткани. При анализе исследования мазков из носа и зева от 12 апреля на COVID-19 методом ПЦР получен отрицательный результат. На 13-й день лечения больной был выписан из стационара под наблюдение врача по месту жительства.

У больного С. на 3-й день пребывания в стационаре отмечалось резкое ухудшение состояния: повышение температуры до 39,5°C, нарастание одышки смешанного характера в покое, ощущение нехватки воздуха, увеличение ЧДД до 28 в минуту, SpO₂ снизилось до 88%. Это сочеталось с прогрессированием лимфопении до 15%, лейкопении сменилась лейкоцитозом до 11,4 × 10⁹/л, увеличились уровни ЛДГ до 380 ед/л, СРБ до 33 мг/мл и D-димера до 900 нг/мл.

При проведении рентгенологического исследования выявлено прогрессирование поражения легких более 70%, начальные признаки острого респираторного дистресс-синдрома. Учитывая снижение уровня SpO₂ до 88%, поражение паренхимы легких более 70%, консилиумом врачей состояние больного оценено как крайне тяжелое, и было принято решение о проведении неинвазивной оксигенотерапии через лицевую маску с накопителем, скорость подачи кислорода 12 л/мин, прон-позиция на животе не менее 16 часов в день. При кислородной поддержке уровень SpO₂ был 95%.

С учетом тяжести состояния больному в дополнение к проводимому лечению были назначены антибактериальные препараты (внутривенно — меропенем по 1 г 3 раза в сутки, левофлоксацин в дозе 500 мг два раза в сутки), препарат моноклональных антител к IL-6 — олокизумаб (Артлегиа), 160 мг подкожно.

В течение следующих трех дней состояние пациента оставалось стабильно тяжелым, повторно вводился олокизумаб, а также был назначен селективный обратимый ингибитор Янускиназы 1 и 2 (барицитиниб) по 4 мг в сутки.

По результатам лабораторных исследований у больного С. сохранялась лимфопения — 6%, уровень СРБ снизился до 6 мг/мл, содержание D-димера увеличилось до 2680 нг/мл, что почти в 10 раз превышало нормальные значения. При проведении ультразвукового исследования плевральных полостей отмечалась резко выраженная консолидация легочной ткани, также обнаружены УЗИ-признаки гепатоспленомегалии, диффузные изменения паренхимы печени, поджелудочной железы, почек. Состояние больного оставалось стабильно тяжелым.

При проведении рентгенографии органов грудной клетки на 12-й день лечения отмечена небольшая положительная динамика: слева уменьшилась инфильтрация с сохранением прежней протяженности поражения легоч-

ной паренхимы, справа отмечалась тенденция к увеличению интенсивности инфильтрации в периферических зонах, преимущественно в проекции S3, 4, 5, 6, 8, 9, что расценено как стабилизация процесса.

На 16-й день лечения проведена КТ органов грудной клетки в динамике: в периферических отделах обоих легких выявлены округлые участки уплотнения легочной ткани по типу «матового стекла» на фоне неравномерного утолщения внутридолькового интерстиция, ориентировочный объем поражения правого легкого снизился с 75 до 40%, левого — с 70 до 35%, визуализировались медиастинальные лимфоузлы до 0,7–1,3 см, в кардиоваскулярной зоне отмечена небольшая дилатация сердца, КТИ до 0,58.

В лабораторных показателях также отмечена положительная динамика: увеличение количества лимфоцитов до 16%, снижение СРБ до 4 мг/мл, ферритина до 122 нг/мл, D-димера до 1200 нг/мл. Субъективно у больного отмечалось улучшение самочувствия: уменьшение одышки, кашля, снижение температуры тела до нормальных значений, улучшение аппетита. В течение следующих двух дней наблюдалась выраженная положительная динамика. Результат анализа исследования мазков из носа и зева от 18 апреля на COVID-19 методом ПЦР был отрицательный, и на 19-й день пребывания в стационаре больной выписан для проведения реабилитации по месту жительства.

Заключение

Таким образом, существенные различия в тяжести течения новой коронавирусной инфекции у однояйцевых близнецов с одинаковым анамнезом, отсутствием отягощающих коморбидных состояний, вероятнее всего, обусловлены начальной дозой вирусной нагрузки, явившейся важным фактором, определяющим развитие и течение инфекции [6, 8]. Инфицирование большим количеством вирусных частиц вызывает неадекватно сильный иммунный ответ с включением врожденного и адаптивного иммунитета [7, 9]. Результатом активации клеток врожденного иммунитета является синтез большого количества провоспалительных цитокинов, в том числе интерферонов, хемокинов и других медиаторов воспаления, а также стимуляция макрофагов и дендритных клеток, индуцирующих развитие клеточного и гуморального иммунного ответа, что способствует дальнейшему прогрессированию воспалительного процесса [4, 14]. При инфицировании меньшим количеством вируса защитный иммунный ответ развивается адекватно, без резкой продукции биологически активных веществ [3, 7]. Согласно нашему наблюдению, мероприятия, направленные на уменьшение вирусной нагрузки, могут оказаться решающими для разработки эффективных методов лечения и профилактики новой коронавирусной инфекции COVID-19.

Список литературы/References

1. Баклашев В.П., Кулемзин С.В., Горчаков А.А., Лесняк В.Н., Юсубалиева Г.М., Сотникова А.Г. COVID-19. Этиология, патогенез, диагностика и лечение // Клиническая практика. 2020. Т. 11, № 1. С. 7–20. [Baklaushev V.P., Kulemzin S.V., Gorchakov A.A., Lesnyak V.N., Yusubaliev G.M., Sotnikova A.G. COVID-19. Etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Klinicheskaya praktika = Journal of Clinical Practice*, 2020, vol. 11, no. 1, pp. 7–20. (In Russ.)] doi: 10.17816/clinpract26339
2. Йокота Ш., Куройва Е., Нишиока К. Новая коронавирусная болезнь (COVID-19) и «цитокиновый шторм». Перспективы эффективного лечения с точки зрения патофизиологии воспалительного процесса // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9, № 4. С. 13–25. [Yokota Sh., Kuroyva E., Nishioka K. New coronavirus disease (COVID-19) and “cytokine storm”. Prospects for effective treatment from the point of view of the pathophysiology of the inflammatory process. *Infektsionnye bolezni: novosti, mnenia, obuchenie = Infectious diseases: News, Opinions, Education*, 2020, vol. 9, no. 4, pp. 13–25. (In Russ.)] doi: 10.33029/2305-3496-2020-9-4-13-25
3. Костинов М.П., Шмитко А.Д., Полищук В.Б., Хромова Е.А. Современные представления о новом коронавирусе и заболевании, вызванном SARS-COV-2 // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9, № 2. С. 33–42. Kostinov M.P., Shmitko A.D., Polishchuk V.B., Khromova E.A. Modern ideas about the new coronavirus and the disease caused by SARS-COV-2. *Infektsionnye bolezni: novosti, mnenia, obuchenie = Infectious diseases: News, Opinions, Education*, 2020, vol. 9, no. 2, pp. 33–42. (In Russ.)] doi: 10.33029/2305-3496-2020-9-2-33-42
4. Лобанова О.А., Трусова Д.С., Руденко Е.Е., Проценко Д.Д., Коган Е.А. Патоморфология новой коронавирусной инфекции COVID-19 // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. 2020. Т. 35, № 3. С. 47–52. [Lobanova O.A., Trusova D.S., Rudenko E.E., Protsenko D.D., Kogan E.A. Pathomorphology of a new coronavirus infection COVID-19. *Sibirskiy zhurnal klinicheskoy i eksperimentalnoy meditsiny = Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2020, vol. 35, no. 3, pp. 47–52. (In Russ.)] doi: 10.29001/2073-8552-2020-35-3-47-52
5. Малинникова Е.Ю. Новая коронавирусная инфекция. Сегодняшний взгляд на пандемию XXI века // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9, № 2. С. 18–32. [Malinnikova E.Yu. New coronavirus infection. Today's look at the pandemic of the XXI century. *Infektsionnye bolezni: novosti, mnenia, obuchenie = Infectious diseases: News, Opinions, Education*, 2020, vol. 9, no. 2, pp. 18–32. (In Russ.)] doi: 10.33029/2305-3496-2020-9-2-18-32
6. Никифоров В.В., Суранова Т.Г., Чернобровкина Т.Я., Янковская Я.Д., Булова С.В. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): клинико-эпидемиологические аспекты // Архив внутренней медицины. 2020. Т. 10, № 2. С. 87–93. [Nikiforov V.V., Suranova T.G., Chernobrovkina T.Ya., Yankovskaya Y.D., Burova S.V. New coronaviral infection (COVID-19):

- clinical and epidemiological aspects. *Arkhiv vnutrenney meditsiny = The Russian Archives of Internal Medicine*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 87–93. (In Russ.) doi: 10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93
7. Пашенков М.В., Хайтов М.Р. Иммуный ответ против эпидемических коронавирусов // Иммунология. 2020. Т. 41, № 1. С. 5–18. [Pashenkov M.V., Khaitov M.R. Immune response against epidemic coronaviruses. *Immunologiya = Immunologiya*, 2020, vol. 41, no. 1, pp. 5–18. (In Russ.) doi: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-5-18
 8. Романов Б.К. Коронавирусная инфекция COVID-2019 // Безопасность и риск фармакотерапии. 2020. Т. 8, № 1. С. 3–8. [Romanov B.K. Coronavirus disease COVID-2019. *Bezopasnost i risk farmakoterapii = Safety and Risk in Pharmacotherapy*, 2020, vol. 8, no. 1, pp. 3–8. (In Russ.) doi:10.30895/2312-7821-2020-8-1-3-8
 9. Смирнов В.С., Тотолян Арег А. Врожденный иммунитет при коронавирусной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 259–268. [Smirnov V.S., Totolian Areg A. Innate immunity in coronavirus infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 259–268. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-III-1440
 10. Федорова А.А., Кутепов Д.Е., Зубарев А.В., Пасечник И.Н. Комплексный подход к диагностике и лечению больного COVID-19 (клинический случай) // Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2020. Т. 4. С. 114–117. [Fedорова A.A., Kutepov D.E., Zubarev A.V., Pasechnik I.N. An integrated approach to the diagnosis and treatment of a patient with COVID-19 (clinical case). *Kremlevskaya meditsina. Klinicheskiy vestnik = Kremlin medicine. Clinical Bulletin*, 2020, vol. 4, pp. 114–117. (In Russ.) doi: 10.26269/cImy-ra52
 11. Ghomi R., Asgari N., Hajihaydari A., Esteki R., Biyabanaki F., Nasirinasab F. The COVID-19 pandemic: a systematic review of the current evidence. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 655–663. doi: 10.15789/2220-7619-TCP-1508
 12. 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: 110.1016/S0140-6736(20)30183-5
 13. Jordan R.E., Adab P., Cheng K.K. Covid-19: risk factors for severe disease and death. *BMJ*, 2020, vol. 368: m1198. doi: 10.1136/bmj.m1198
 14. 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*, 2020, vol. 395, no. 10229, pp. 1033–1034. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0
 15. Wu C., Chen X., Cai Y., Xia J., Zhou X., Xu S., Huang H., Zhang L., Zhou X., Du C., Zhang Y., Song J., Wang S., Chao Y., Yang Z., Xu J., Zhou X., Chen D., Xiong W., Xu L., Zhou F., Jiang J., Bai C., Zheng J., Song Y. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med.*, 2020, vol. 180, no. 7, pp. 934–943. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.1429

Авторы:

Юдина С.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической иммунологии, аллергологии и фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Курск, Россия;

Киселева В.В., к.м.н., доцент, зав. кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Курск, Россия;

Русанова Т.С., к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Курск, Россия;

Иванова И.А., к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Курск, Россия.

Authors:

Yudina S.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Phthiisopulmonology, Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russian Federation;

Kiseleva V.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russian Federation;

Rusanova T.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Phthiisopulmonology, Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russian Federation;

Ivanova I.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Phthiisopulmonology, Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.01.2022
Принята к печати 25.02.2022

Received 20.01.2022
Accepted 25.02.2022

УСИЛЕНИЕ ГЕНЕРАЦИИ ГИДРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ДИАМИНОВ КАК ПРОЯВЛЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ МИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

А.П. Годовалов, Т.И. Карпунина, И.А. Морозов

ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь, Россия

Резюме. В последнее время интерес к исследованию роли полиаминов в межклеточных взаимоотношениях, особенно в очаге воспаления, где наблюдается накопление этих поликатионов, увеличивается. Особое внимание в этом плане привлекают продукты микробного происхождения — кадаверин и путресцин. Описана роль полиаминов как «скавенджеров» свободных радикалов, но до сих пор нет данных о их влиянии на радикал-продуцирующую активность лейкоцитов. Цель исследования — изучение особенностей генерации гидроксильных радикалов лейкоцитами человека под влиянием полиаминов микробного происхождения. **Материалы и методы.** Пробы периферической венозной крови были получены от 20 практически здоровых доноров. Для оценки продукции кислородных радикалов проводили реакцию люминол-зависимой хемилюминесценции с лейкоцитами крови, предварительно инкубированными с кадаверином (0,01 М) и путресцином (0,01 М). Измерение проводили на люминометре Luminoskan Ascent® Thermo Labsystems (США) в течение 180 мин. Для статистического анализа использовали интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (RLU). **Результаты и обсуждение.** Показано, что кадаверин оказывает стимулирующее влияние на способность лейкоцитов к продукции радикалов (усредненная площадь под кривой $6,7 \pm 0,7$ у.е., $p < 0,05$). Путресцин слабо влиял на радикал-продуцирующую активность клеток человека ($2,8 \pm 0,4$ у.е., $p < 0,05$). Такая ситуация может быть обусловлена непосредственным влиянием поликатионов на механизмы генерации радикалов, а также увеличением активности диаминооксидазы лейкоцитов, которая катализирует превращение диаминов в аминокальдегид, что сопровождается выделением перекиси водорода, вступающей в реакцию с люминолом. Кроме того, фермент инактивирует и другие соединения, такие как гистамин, что приводит к формированию менее выраженной клинической картины. Полиамины, в частности кадаверин и путресцин, можно отнести к факторам ремоделирования метаболической активности лейкоцитов организма-хозяина, что направлено на сохранение жизнеспособности и увеличение численности микроорганизмов. **Заключение.** Таким образом, кадаверин и путресцин, продукция которых осуществляется микроорганизмами в зависимости от условий микроокружения, очевидно, могут рассматриваться в качестве медиаторов, опосредующих мало- или бессимптомное течение воспалительных заболеваний, что способствует реализации персистентного потенциала бактерий.

Ключевые слова: кадаверин, путресцин, лейкоциты, гидроксильные радикалы, хемилюминесценция, микроорганизмы.

Адрес для переписки:

Годовалов Анатолий Петрович
614990, Россия, г. Пермь, ул. Екатерининская, 85,
ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский
университет им. акад. Е.А. Вагнера МЗ РФ.
Тел.: 8 (342) 236-44-85, 8 (912) 981-51-00.
E-mail: AGodovalov@gmail.com

Contacts:

Anatoliy P. Godovalov
614990, Russian Federation, Perm, Ekaterininskaya str., 85,
Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner.
Phone: +7 (342) 236-44-85, +7 (912) 981-51-00.
E-mail: AGodovalov@gmail.com

Для цитирования:

Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Морозов И.А. Усиление генерации гидроксильных радикалов лейкоцитами человека в присутствии бактериальных диаминов как проявление иммуномодулирующего влияния микробных метаболитов // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 575–579. doi: 10.15789/2220-7619-EHR-1771

Citation:

Godovalov A.P., Karpunina T.I., Morozov I.A. Enhanced hydroxyl radical generation by human leukocytes exposed to bacterial diamines highlighting immunomodulatory effect of microbial metabolites // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 575–579. doi: 10.15789/2220-7619-EHR-1771

© Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Морозов И.А., 2022

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-EHR-1771>

ENHANCED HYDROXYL RADICAL GENERATION BY HUMAN LEUKOCYTES EXPOSED TO BACTERIAL DIAMINES HIGHLIGHTING IMMUNOMODULATORY EFFECT OF MICROBIAL METABOLITES

Godovalov A.P., Karpunina T.I., Morozov I.A.

E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Abstract. Recently, there have been increasing an interest to study a role of polyamines in intercellular interactions, especially in the focus of inflammation, where accumulation of such polycations is observed. In this regard, products of microbial origin — cadaverine and putrescine — are of particular attention. The role of polyamines as «scavengers» of free radicals has been described, but no data of their effect on the leukocyte radical-producing activity have been obtained so far. The aim of the investigation was to study features of hydroxyl radical generation by human leukocytes exposed to microbe-derived polyamines. *Materials and methods.* Peripheral venous blood samples were obtained from 20 healthy donors. To assess radical production, a luminol-dependent chemiluminescence reaction was carried out with blood leukocytes pre-incubated with cadaverine (0.01 M) and putrescine (0.01 M), measured on a Luminoskan Ascent® Thermo Labsystems luminometer (USA) for 180 min. For statistical analysis, an integral chemiluminescence index was used for the entire measurement period (RLU). *Results and discussion.* It was shown that cadaverine has a stimulating effect on the leukocyte potential to produce radicals (averaged area under the curve is 6.7 ± 0.7 r.u., $p < 0.05$). Putrescine had little effect on the radical-producing activity of human cells (2.8 ± 0.4 r.u., $p < 0.05$). This might be due to the direct influence of polycations on the mechanisms of radical generation, as well as increased activity of leukocyte diamine oxidase catalyzing the conversion of diamines into aminoaldehyde, which is accompanied by the release of hydrogen peroxide reacting with luminol. In addition, the enzyme inactivates other compounds, such as histamine leading to formation of a less pronounced clinical picture. Polyamines, particularly cadaverine and putrescine, can be referred to the factors remodeling the metabolic activity of the host leukocytes, which is aimed at maintaining the viability and increasing the number of microorganisms. *Conclusion.* Thus, cadaverine and putrescine produced by microorganisms, depending on the conditions of the microenvironment, might be evidently considered as mediators of the mild or asymptomatic course of inflammatory diseases, which contributes to underlying persistent potential of bacteria.

Key words: *cadaverine, putrescine, leukocytes, hydroxyl radicals, chemiluminescence, microorganisms.*

В современной микробиологии наблюдается смена лидирующих тенденций: возбудители острых инфекционных заболеваний отходят на второй план, в то время как этиология и патогенез состояний со стертой клиникой, а тем более бессимптомная инфекция или носительство, оставаясь по сей день относительно малоизученными, привлекают все большее внимание исследователей. Отчасти такие метаморфозы связаны с наращиванием условно патогенной микрофлорой персистентного потенциала. Еще в середине прошлого века сначала Hobby G.L. (1942), а позднее Bigger J.W. обратили внимание на отсутствие полной стерилизации пенициллином культур *Staphylococcus aureus* [7]. Именно Bigger J.W. впервые применил к выжившей субпопуляции бактерий название клетки-персисторы («неделяющиеся, бездействующие клетки») [7]. Однако лишь через несколько десятков лет была осознана значимость проблемы персистенции микроорганизмов [11, 16].

Персистентный потенциал обеспечивается различными приспособительными механизмами, выработанными бактериями в процессе эволюции, и универсален как для патогенов, так и для представителей индигенной микрофлоры [1]. Памятуя о том, что противомикробную защиту в организме человека, наряду с гуморальными факторами, осуществляют иммунокомпетентные клетки [10], логично предположить наличие у персистирующих бактерий метаболитов, оказывающих опреде-

ленное влияние непосредственно на функциональную активность клеточных эффекторов иммунитета.

В последнее время возрастает интерес к исследованию роли полиаминов (ПА) в межклеточных взаимоотношениях, особенно в очаге воспаления, где наблюдается накопление этих поликатионов [14, 19]. Привлекают внимание в этом плане ПА микробного происхождения — кадаверин и путресцин [23]. Показано, что такие факторы, как дефицит питательных веществ, действие антимикробных и других реактантов, которые в очаге воспаления представлены в большом количестве, увеличивает скорость синтеза кадаверина и путресцина *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* [5, 6, 21]. Описана роль ПА как «скавенджеров» свободных радикалов [13], но до сих пор нет данных об их влиянии на радикал-продуцирующую активность лейкоцитов. Известно, что генерация активных форм кислорода (пероксид водорода, супероксидный анион-радикал, синглетный кислород, гидроксильный радикал, гипохлорид) является ключевым звеном деструкции фагоцитированных объектов [18]. Нарушение этого компонента фагоцитоза приводит к его незавершенности, когда микроорганизмы успешно персистируют в цитоплазме фагоцитов [12, 24].

Цель исследования — изучение особенностей генерации гидроксильных радикалов лейкоцитами человека под влиянием полиаминов микробного происхождения.

Материалы и методы

Пробы периферической венозной крови были получены от 20 практически здоровых доноров. Для оценки продукции гидроксильных радикалов проводили реакцию люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) с лейкоцитами крови [22], выделенными методом седиментации с 0,1% метилцеллюлозой (Sigma-Aldrich, США), с последующей преинкубацией с кадаверином (0,01 М) и путресцином (0,01 М) в течение 60 мин при 37°C. При постановке реакции ЛЗХЛ использовали 2×10^{-4} М натриевой соли люминола (Sigma, США), предварительно обработанные ПА клетки (25×10^6 /мл) и неопсонизированный зимозан (конечные концентрации 15, 150 и 1500 мкг/мл). Измерение проводили на люцинометре Luminoskan Ascent® (Thermo Labsystems, США) в течение 180 мин. Для статистического анализа использовали интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (RLU).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Statistica 7.0.

Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. В случае распределения, приближенного к нормальному, использовали t-критерий Стьюдента, в остальных случаях — критерий Манна–Уитни для оценки значимости различий. За пороговый уровень значимости принимали величину $p < 0,05$. Результаты представлены в виде среднего и его ошибки ($M \pm m$).

Результаты и обсуждение

При оценке радикал-продуцирующей функции лейкоцитов показано, что классический стимулятор зимозан оказывал дозозависимое влияние на синтез активных форм кислорода (рис., А). Средняя площадь под кривой, описывающей генерацию радикалов при использовании зимозана в концентрации 15 мг/мл, составила $3,1 \pm 0,4$ у.е., 150 мг/мл — $5,5 \pm 1,2$ у.е. ($p = 0,05$) и 1500 мг/мл — $9,1 \pm 1,3$ у.е. ($p < 0,05$ к концентрации 15 и 150 мг/мл).

Преинкубация клеток с ПА оказывала неоднозначное действие на способность лейко-

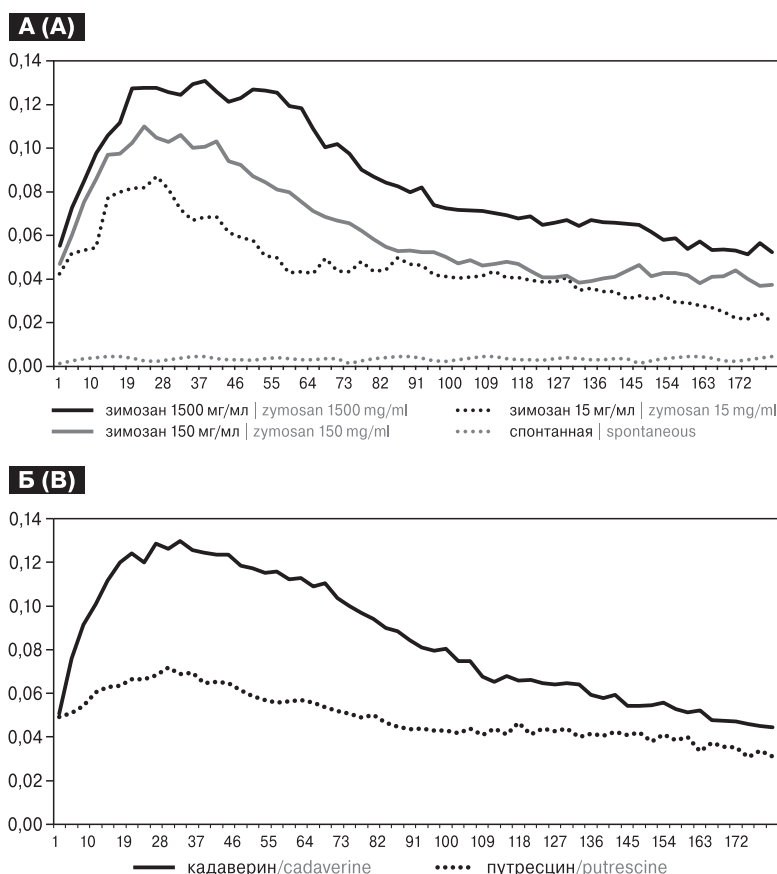


Рисунок. Влияние зимозана (А), кадаверина и путресцина (Б) на радикал-продуцирующую активность лейкоцитов

Figure. Zymosan (A), cadaverine and putrescine (B) affecting leukocyte radical-production activity

Примечание. По оси ординат — интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (RLU), по оси абсцисс — минуты.

Note. Y-axis: integral chemiluminescence index for the entire measurement period (RLU), x-axis: duration (minutes).

цитов к продукции радикалов. Так, действие кадаверина сопоставимо с таковым при максимальной концентрации зимозана (рис., Б). Усредненная площадь под кривой составила $6,7 \pm 0,7$ у.е. ($p < 0,05$ к пробам с зимозаном в концентрации 15 мг/мл). В противоположность этому, после предобработки клеток путресцином максимальный уровень радикал-продуцирующей активности не достигал такового при минимальной концентрации зимозана (рис., Б). Площадь под кривой в пробах лейкоцитов, предобработанных путресцином — $2,8 \pm 0,4$ у.е. ($p < 0,05$ к пробам с зимозаном в концентрации 150 и 1500 мг/мл).

Синтез полиаминов бактериальными клетками в очаге воспаления необходим по ряду причин и основная среди них — защита от активных форм кислорода, которые в большом количестве продуцируются лейкоцитами. В такой ситуации логично предположить повышение уровня полиаминов микробного происхождения в очаге, что было зарегистрировано нами ранее [2, 4]. Кроме этого нами показано влияние путресцина и кадаверина на поглотительную активность нейтрофилов и моноцитов [3]. На этом фоне выявленное в настоящем исследовании увеличение продукции радикалов предобработанными нейтрофилами и моноцитами кажется парадоксальным, но среди причин такой ситуации можно рассматривать и непосредственное влияние поликатионов на механизмы генерации радикалов [18], и активность диаминооксидазы лейкоцитов. Этот фермент катализирует превращение диаминов в аминокальдегид, что сопровождается выделением перекиси водорода, которая взаимодействует с люминолом [20], присутствующим в реакционной смеси. Повышение активности диаминооксидазы при активации лейкоцитов является закономерным феноменом. В исследова-

ниях Nouen G. и соавт. [15] показано, что активность диаминооксидазы увеличивается практически сразу после активации фагоцитирующих клеток. При этом фермент выполняет антимедиаторную противовоспалительную функцию, инактивируя гистамин и другие диамины, в том числе кадаверин и путресцин [9]. Такая ситуация является благоприятной для микроорганизмов, когда их структуры защищены избытком полиаминов и они в свою очередь активируют антимедиаторный фермент, результатом деятельности которого в итоге будет снижение активности воспаления [8, 25], что и было прослежено нами в исследованиях *in vivo* [2].

Различия в степени воздействия кадаверина и путресцина возможно связаны с разными механизмами их влияния на фагоцитирующие клетки. Путресцин — исходное соединение для синтеза двух физиологически активных полиаминов — спермидина и спермина [17], которые могут оказывать ингибирующее влияние на генерацию кислородсодержащих продуктов.

Заключение

Таким образом, предложенная нами ранее гипотеза о том, что ПА представляют собой рецептор-независимый фактор микробной агрессии [3], с одной стороны, благодаря полученным результатам, находит свое подтверждение, но в то же время прослеживается полифункциональность этих соединений. Кадаверин и путресцин, продукция которых осуществляется микроорганизмами в зависимости от условий микроокружения, очевидно, можно рассматривать в качестве медиаторов, опосредующих мало- или бессимптомное течение воспалительных заболеваний, что способствует реализации персистентного потенциала бактерий.

Список литературы/References

1. Бухарин О.В. Адаптивные стратегии взаимодействия возбудителя и хозяина при инфекции // Вестник Российской академии наук. 2018. Т. 88, № 7. С. 637–643. [Bukharin O.V. Adaptive strategies for the interaction of the pathogen and the host during infection. *Vestnik Rossijskoj akademii nauk = Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 2018, vol. 88, no. 7, pp. 637–643. (In Russ.)] doi: 10.31857/S086958730000087-3
2. Годовалов А.П., Даниелян Т.Ю., Карпунина Т.И., Вавилов Н.В. Опыт изучения микрофлоры и белков эякулята при разной эхоскопической картине предстательной железы // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 347–353. [Godovalov A.P., Danielyan T.Yu., Karpunina T.I., Vavilov N.V. Experience in studying the microflora and proteins of ejaculate with different echoscopic picture of the prostate gland. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 347–353. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-347-353
3. Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Нестерова Л.Ю., Морозов И.А. Полиамины как рецептор-независимые факторы агрессии условно-патогенных микроорганизмов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2019. № 3. С. 91–94. [Godovalov A.P., Karpunina T.I., Nesterova L.Yu., Morozov I.A. Polyamines as receptor-independent factors of aggression of opportunistic microorganisms. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2019, no. 3, pp. 91–94. (In Russ.)] doi: 10.14427/jipai.2019.3.91
4. Морозов И.А., Карпунина Т.И., Годовалов А.П. Кадаверин как регулятор активности про- и эукариотических клеток // Аллергология и иммунология. 2018. Т. 19, № 3. С. 149–150. [Morozov I.A., Karpunina T.I., Godovalov A.P. Cadaverine as a regulator of the activity of pro- and eukaryotic cells. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2018, vol. 19, no. 3, pp. 149–150. (In Russ.)]

5. Нестерова Л.Ю., Негорелова Е.В., Ткаченко А.Г. Биогенные полиамины как модуляторы активности Quorum sensing системы и биопленкообразования *Vibrio harveyi* // Вестник Пермского университета. Серия «Биология». 2019. № 3. С. 300–308. [Nesterova L.Yu., Negorelova E.V., Tkachenko A.G. Biogenic polyamines as modulators of the activity of the Quorum sensing system and biofilm formation of *Vibrio harveyi*. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya "Biologiya" = Bulletin of Perm University. Biology Series*, 2019, no. 3, pp. 300–308. (In Russ.)] doi: 10.17072/1994-9952-2019-3-300-308
6. Ткаченко А.Г. Стрессорные ответы бактериальных клеток как механизм развития толерантности к антибиотикам // Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54, № 2. С. 110–133. [Tkachenko A.G. Stress responses of bacterial cells as a mechanism for the development of tolerance to antibiotics. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2018, vol. 54, no. 2, pp. 110–133. (In Russ.)] doi: 10.7868/S0555109918020022
7. Bigger J.W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *Lancet*, 1944, vol. 244, no. 6320, pp. 497–500. doi: 10.1016/S0140-6736(00)74210-3
8. Brown S.P., Cornforth D.M., Mideo N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. *Trends Microbiol.*, 2012, vol. 20, no. 7, pp. 336–342. doi: 10.1016/j.tim.2012.04.005
9. Equi A.M., Brown A.M., Cooper A., Her S.K., Watson A.B., Robins D.J. Oxidation of putrescine and cadaverine derivatives by diamine oxidases. *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, no. 3, pp. 507–518. doi: 10.1016/S0040-4020(01)90506-X
10. Ferguson J.S., Weis J.J., Martin J.L., Schlesinger L.S. Complement protein C3 binding to mycobacterium tuberculosis is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 5, pp. 2564–2573. doi: 10.1128/IAI.72.5.2564-2573.2004
11. Fisher R.A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 15, no. 8, pp. 453–464. doi: 10.1038/nrmicro.2017.42
12. Flannagan R.S., Jaumouillé V., Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.*, 2012, no. 7, pp. 61–98. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132445
13. Fujisawa S., Kadoma Y. Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer Res.*, 2005, vol. 25, no. 2A, pp. 965–969.
14. Hesterberg R.S., Cleveland J.L., Epling-Burnette P.K. Role of polyamines in immune cell functions. *Med. Sci. (Basel)*, 2018, vol. 6, no. 1: 22. doi: 10.3390/medsci6010022
15. Houen G., Högdall E.V., Barkholt V., Nørskov L. Lactoferrin: similarity to diamine oxidase and purification by aminohexyl affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.*, 1996, vol. 241, no. 1, pp. 303–308. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0303t.x
16. Huemer M., Mairpady Shambat S., Brugger S.D., Zinkernagel A.S. Antibiotic resistance and persistence-implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep.*, 2020, vol. 21, no. 12: e51034. doi: 10.15252/embr.202051034
17. Igarashi K., Kashiwagi K. Characterization of genes for polyamine modulon. *Methods Mol. Biol.*, 2011, no. 720, pp. 51–65. doi: 10.1007/978-1-61779-034-8_3
18. Janeway C.A. Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002, vol. 20, pp. 197–216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
19. Lohinai Z., Keremi B., Szoko E., Tabi T., Szabo C., Tulassay Z., Levine M. Bacterial lysine decarboxylase influences human dental biofilm lysine content, biofilm accumulation, and subclinical gingival inflammation. *J. Periodontol.*, 2012, vol. 83, no. 8, pp. 1048–1056. doi: 10.1902/jop.2011.110474
20. Mei Y., Ran L., Ying X., Yuan Z., Xin S. A sequential injection analysis/chemiluminescent plant tissue-based biosensor system for the determination of diamine. *Biosens Bioelectron.*, 2007, vol. 22, no. 6, pp. 871–876. doi: 10.1016/j.bios.2006.03.003
21. Shah P., Swiatlo E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.*, 2008, vol. 68, no. 1, pp. 4–16. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06126.x.
22. Shilov J.I., Orlova E.G. Role of adrenergic mechanisms in regulation of phagocytic cell functions in acute stress response. *Immunology Letters*, 2003, no. 86, pp. 229–233. doi: 10.1016/S0165-2478(03)00027-0
23. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.*, 1985, vol. 49, no. 1, pp. 81–99. doi: 10.1128/mr.49.1.81-99.1985
24. Teng T.-S., Ji A., Ji X.-Y., Li Y.-Z. Neutrophils and immunity: from bactericidal action to being conquered. *J. Immunol. Res.*, 2017, vol. 2017: 9671604. doi: 10.1155/2017/9671604
25. Uribe-Querol E., Rosales C. Control of phagocytosis by microbial pathogens. *Front. Immunol.*, 2017, no. 8: 1368. doi: 10.3389/fimmu.2017.01368

Авторы:

Годовалов А.П., к.м.н., ведущий научный сотрудник ЦНИЛ, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера МЗ РФ, г. Пермь, Россия;
Карпунина Т.И., д.б.н., профессор, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера МЗ РФ, г. Пермь, Россия;
Морозов И.А., студент лечебного факультета ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера МЗ РФ, г. Пермь, Россия.

Authors:

Godovalov A.P., PhD (Medicine), Leading Researcher of the Central Scientific Laboratory; Associate Professor, Department of Microbiology and Virology, Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation;
Karpunina T.I., PhD, MD (Biology), Professor, Professor of the Department of Microbiology and Virology, Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation;
Morozov I.A., Student of Medical Faculty, Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation.

Поступила в редакцию 18.07.2021
 Принята к печати 28.02.2022

Received 18.07.2021
 Accepted 28.02.2022

ОЦЕНКА АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К НЕКОТОРЫМ ПЛЕСНЕВЫМ ГРИБАМ

В.А. Метельская, Н.С. Матвеевская, О.Г. Гречишникова, А.В. Сафронова

Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

Резюме. Проведена оценка аллергической сенсibilизации 894 пациентов (из них 478 человек — в 2018 г. и 416 — в 2019 г.), проходивших обследование в консультативно-диагностическом центре Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, к некоторым плесневым грибам путем определения в сыворотке крови специфических IgE-антител высокоспецифичным и высокочувствительным методом иммуноблота (тест-системы RIDA AllergyScreen, R-Biopharm AG, Германия). Установлена распространенность лиц с повышенным уровнем специфических IgE-антител к плесневым грибам *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum* и *Penicillium notatum*. Все обследуемые пациенты были поделены на две возрастные группы: 1 — группа детей в возрасте от 1 года до 17 лет, всего за два года 548 детей (из них 303 девочки и 245 мальчиков), 2 — группа взрослых в возрасте от 18 лет и старше, всего за два года 346 человек (из них 231 женщина и 115 мужчин). **Результаты.** В 2018 г. при исследовании образцов сывороток 478 пациентов атопическая сенсibilизация к плесневым грибам была выявлена у 25,3% (n = 121) обследованных, из них в I группе — 17,9% (n = 86), во II — 7,4% (n = 35). В 2019 г. из 416 образцов сывороток атопическая сенсibilизация к плесневым грибам была выявлена у 20,7% (n = 86) обследованных, из них в I группе — 13,5% (n = 56), во II — 7,2% (n = 30). В 2018 г. из 121 положительных образцов специфические IgE-антитела к разным плесневым грибам немного чаще определялись у лиц женского пола — 53,7% (n = 65), из них девочек было 75,3% (n = 49), женщин — 24,7% (n = 16). В 2019 г. из 86 положительных образцов специфические IgE-антитела к разным плесневым грибам немного чаще определялись у лиц мужского пола — 51,2% (n = 44), из них мальчиков было 79,5% (n = 35), мужчин — 20,5% (n = 9). Наиболее часто выявлялась атопическая сенсibilизация к плесневому грибу *Alternaria alternata*: за рассматриваемый период времени из 207 положительных образцов она была определена в 186 пробах (89,9%). IgE-антитела в сыворотке крови к плесневым грибам чаще определяются у детей в возрасте до 17 лет вне зависимости от пола пациента.

Ключевые слова: специфические IgE-антитела, распространенность, иммуноблот, плесневые грибы, атопическая сенсibilизация, аллергическая реакция.

ESTIMATING ALLERGIC SENSITIZATION TO SOME MOLD FUNGI

Metelskaya V.A., Matveevskaya N.S., Grechishnikova O.G., Safronova A.V.

G.N. Gabrichevsky Scientific Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The assessment of allergic sensitization of 894 patients (478 and 416 of them examined in 2018 and 2019, respectively) who were examined at the consultative and Diagnostic center of G.N. Gabrichevsky Scientific Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, for some mold fungi was carried out by measuring serum specific IgE an-

Адрес для переписки:

Метельская Валерия Алексеевна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского.
Тел.: 8 906 733-83-07.
E-mail: pevek.1972@mail.ru

Contacts:

Valeria A. Metelskaya
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
G.N. Gabrichevsky Scientific Research Institute for Epidemiology
and Microbiology.
Phone: +7 906 733-83-07.
E-mail: pevek.1972@mail.ru

Для цитирования:

Метельская В.А., Матвеевская Н.С., Гречишникова О.Г., Сафронова А.В.
Оценка аллергической сенсibilизации к некоторым плесневым
грибам // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 580–584.
doi: 10.15789/2220-7619-EAS-1836

Citation:

Metelskaya V.A., Matveevskaya N.S., Grechishnikova O.G., Safronova A.V.
Estimating allergic sensitization to some mold fungi // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3,
pp. 580–584. doi: 10.15789/2220-7619-EAS-1836

tibody level by using a highly specific and highly sensitive immunoblot method (RIDA AllergyScreen test systems, R-Biopharm AG, Germany). The prevalence of patients with elevated levels of specific IgE antibodies to mold fungi *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum* and *Penicillium notatum* was found. All the examined patients at each time point was divided into two age groups: group 1 — children aged 1 to 17 years, 548 children within the two-year period (303 of them girls and 245 boys), group 2 — adults aged at least 18 years old, 346 subjects within the same period (231 of them women and 115 men). **Results.** In 2018, out of 478 serum samples, atopic sensitization to mold fungi was detected in 25.3% (n = 121) of the examined subjects, of which 17.9% (n = 86) and 7.4% (n = 35) was found in group 1 and group 2, respectively. In 2019, out of 416 serum samples, atopic sensitization to mold fungi was detected in 20.7% (n = 86) of the examined subjects, of which 13.5% (n = 56) and 7.2% (n = 30) was found in group 1 and group 2, respectively. In 2018, out of 121 positive samples, specific IgE antibodies to various mold fungi were slightly more often detected in females — 53.7% (n = 65), of which 75.3% (n = 49) and 24.7% (n = 16) were girls and women, respectively. In contrast, in 2019, out of 86 positive samples, specific IgE antibodies to various mold fungi were slightly more often detected in males reaching 51.2% (n = 44), of which 79.5% (n = 35) and 20.5% (n = 9) were boys and men, respectively. Atopic sensitization to the mold fungus *Alternaria alternata* was most often detected: during the study period, out of 207 positive samples, it was found in 186 samples (89.9%). Serum IgE antibodies to mold fungi are more often detected in children under 17, in sex-independent manner.

Key words: specific IgE antibodies, prevalence, immunoblot, mold fungi, atopic sensitization, allergic reaction.

Введение

Отличительной особенностью плесневых грибов является способность колонизировать организм человека, расти и размножаться *in vivo*, воздействуя на иммунную систему. Патологический процесс чаще локализуется в дыхательных путях, приводя к развитию аллергических и грибковых инфекционных заболеваний [3, 4]. Основным путем сенсибилизации микромицетами является аэрогенный, следовательно, аллергеном является воздушная среда с преобладанием спор грибов [4]. При попадании в организм человека с вдыхаемым воздухом, домашней пылью и пищей плесневые грибы могут вызывать развитие аллергических реакций как немедленного, так и замедленного типа на сами грибковые аллергены, а также сочетание различных типов аллергических реакций к патогенным, условно-патогенным и непатогенным плесневым грибам. Наибольшее клиническое распространение имеет IgE-опосредованный тип аллергической реакции [2, 4].

По литературным данным, плесневые грибы *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* и *Aspergillus* составляют примерно 75% всей споровой массы, содержащейся в атмосферном воздухе и воздухе внутри помещений, где определяется более 100 видов грибов [1]. Теплый воздух и высокая влажность — идеальные условия для размножения плесени в атмосферном воздухе, на стенах и в воздухе внутри зданий, а также на продуктах питания. Источники плесневых грибов могут быть наружными (почва в лесу, заплесневелые сено и зерно, городские свалки) и внутренними (плохо проветриваемые жилые помещения, ваннные комнаты, кухни, библиотеки, листья комнатных растений, земля в цветочных горшках (особенно при частом поливе) и т. п.

Все плесневые грибы часто вызывают синуситы, отиты, инфекции кожи, ногтей, легочные

заболевания, поверхностные или глубокие микозы, изредка — более инвазивные или генерализованные инфекции (чаще и наиболее тяжело протекающие у пациентов со сниженным иммунитетом), а также аллергические заболевания: бронхиальную астму, аллергический бронхолегочный аспергиллез и т. п.

Из плесневых грибов *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, а также из разных видов *Penicillium* выделены и охарактеризованы главные аллергены (от 1 до 3) и минорные аллергены (от 6 до 20), некоторые аллергены разных видов имеют сходную антигенную структуру [1, 2]. В настоящее время отсутствуют стандартные критерии оценки биологической активности аллергенов грибов для диагностических тест-систем. Экстракты из спор грибов отличаются по составу аллергенов от экстрактов из мицелия и продуктов метаболизма. Чаще всего в производстве используется мицелий гриба, раствор питательной среды, поддерживающей его рост, и споры [4].

Целью настоящего исследования стало выявление среди проходивших обследование в Консультативно-диагностическом центре (КДЦ) ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского в Москве в 2018 и 2019 гг. детей и взрослых с сенсибилизацией к некоторым видам плесневых грибов: *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus* и *Alternaria alternata*, анализ видовых и количественных показателей сенсибилизации плесневыми грибами за указанный период, а также изучение возрастного и полового состава сенсибилизированных лиц.

Материалы и методы

Проведено аллергологическое исследование 894 сывороток крови пациентов, обратившихся для оказания им медицинских услуг в КДЦ МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (лицензия

на осуществление медицинской деятельности выдана 26.03.2015 г. № ФС-99-01-009026), из них 478 образцов — в 2018 г. и 416 — в 2019 г. С каждым пациентом (законным представителем) заключен договор на получение платных медицинских услуг, в соответствии с которым пациент (законный представитель) дает согласие на обработку своих персональных данных для научного анализа и последующей публикации в специализированной научной медицинской литературе без указания своих личных данных.

Все обследуемые пациенты были поделены на две возрастные группы: I — группа детей в возрасте от 1 года до 17 лет (всего 548 человек, из них — 303 девочки и 245 мальчиков), II — группа взрослых в возрасте от 18 лет и старше (всего 346 человек, из них — 231 женщина и 115 мужчин).

Определяли содержание специфических IgE-антител в сыворотке крови пациентов к аллергенам плесневых грибов *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus* и *Alternaria alternata* методом иммуноблота (тест-система RIDA AllergyScreen, R-Biopharm AG, Германия; регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009/05902).

Тест RIDA AllergyScreen основан на принципе иммуноферментного анализа на нитроцеллюлозных мембранах (иммуноблот). Аллергены в этой тест-системе представлены полными водными экстрактами плесневых грибов, то есть содержат весь набор аллергенов.

Количественную оценку интенсивности окрашивания проводили с помощью экспресс-фотометра RIDA X-Screen для аллергодиагностики *in vitro* с соответствующим программным обеспечением (R-Biopharm AG, Германия; регистрационное удостоверение ФС № 2005/347). Результат получали в МЕ/мл. Классы аллергореактивности (от 0 до 6) назначались автоматически по стандартной кривой. Определенный уровень МЕ/мл соответствовал конкретному классу аллергической реактивности: 0 — IgE-антитела отсутствуют или ниже порога (0,00–0,34 МЕ/мл); 1 — пороговый уровень (0,35–0,69 МЕ/мл); 2 — умеренно увеличенный уровень (0,7–3,49 МЕ/мл); 3 — значительно увеличенный (3,5–17,49 МЕ/мл); 4 — высокий уровень (17,5–49,9 МЕ/мл); 5 — очень высокий уровень (50,0–100,0 МЕ/мл); 6 — исключительно высокий уровень (выше 100,0 МЕ/мл).

Статистическая обработка полученных данных выполнялась на персональном компьютере с применением пакета прикладных программ Microsoft Excel.

Результаты

Распространенность сенсibilизации к грибам в 2018 г. В 2018 г. из 478 обследованных сенсibilизация к плесневым грибам была выявлена у 25,3% (n = 121): в I группе — у 17,9% (n = 86),

во II — у 7,4% (n = 35). Чаще определялись специфические IgE-антитела в сыворотке к *Alternaria alternata* — у 91,7% (n = 111), из них в I группе — у 67,7% (n = 82), во II — у 24,0% (n = 29). У многих из этих же пациентов также была обнаружена сенсibilизация к *Cladosporium herbarum* — у 33,9% (n = 41), из них в I группе — у 21,5% (n = 26), во II — у 12,4% (n = 15), к *Penicillium notatum* — 6,6% (n = 8) всех случаев, из них по 3,3% (n = 4) в I и во II группе. Сенсibilизация к плесневому грибу *Aspergillus fumigatus* встречалась крайне редко: специфические IgE определялись только у двух детей (1,6%) (n = 2), у взрослых они обнаружены не были (рис. 1).

Содержание IgE-антител к аллергенам плесневых грибов в 2018 г. по группам. В I группе среднее содержание IgE в сыворотке крови к грибу *Alternaria* составило 7,48 МЕ/мл, что соответствует 3 классу аллергореактивности, к *Cladosporium* — 2,7 МЕ/мл (2 класс), к *Penicillium* — 0,94 МЕ/мл (2 класс), к *Aspergillus* — 0,68 МЕ/мл (1 класс). У двух детей (n = 2) уровень IgE-антител в сыворотке крови к *Alternaria* составил выше 100,0 МЕ/мл, то есть относился к 6 классу аллергореактивности (рис. 2).

Во II группе среднее содержание IgE к *Alternaria* составило 7,75 МЕ/мл, что соответствует 3 классу аллергореактивности, к *Cladosporium* — 2,6 МЕ/мл (2 класс), к *Penicillium* — 0,68 МЕ/мл (1 класс), к *Aspergillus* сенсibilизации обнаружено не было. Только у одного взрослого пациента (n = 1) уровень IgE-антител к *Alternaria* в сыворотке крови был выше 100,0 МЕ/мл (рис. 3).

Распространенность сенсibilизации к грибам в 2019 г. Из 416 обследованных в 2019 г. сенсibilизация к плесневым грибам была выявлена у 20,7% (n = 86), из них в I группе — у 13,5% (n = 56), во II — у 7,2% (n = 30). Чаще определялась изолированная грибковая сенсibilизация к *Alternaria alternata* — у 87,2% (n = 75), из них в I группе — у 57,0% (n = 49), во II — у 30,2% (n = 26). У многих из этих же людей также была обнаружена аллергия к *Cladosporium herbarum* — у 32,6% (n = 28), из них в I группе — у 17,5% (n = 15), во II — у 15,1% (n = 13), к *Penicillium notatum* — у 5,8% (n = 5), из них 4,6% (n = 4) обследованных I группы и 1,2% (n = 1) — II группы. Сенсibilизация к плесневому грибу *Aspergillus fumigatus* встречалась также крайне редко: она была определена только у 2,3% (n = 2) пациентов: 1,15% (n = 1) в I и столько же во II группе (рис. 1).

Содержание IgE-антител к аллергенам плесневых грибов в 2019 г. по группам. В I группе среднее содержание IgE в сыворотке крови к грибу *Alternaria* составило 19,4 МЕ/мл, что соответствует 4 классу аллергореактивности, к *Cladosporium* — 2,14 МЕ/мл (2 класс), к *Penicillium* — 0,37 МЕ/мл (1 класс), к *Aspergillus* — 0,81 МЕ/мл (2 класс). У 6 детей (n = 6) уровень IgE-антител в сыво-

ротке крови к *Alternaria* был выше 100,0 МЕ/мл, то есть относился к 6 классу аллергореактивности (рис. 2).

В группе взрослых среднее содержание IgE к *Alternaria* было 6,4 МЕ/мл, что соответствует 3 классу аллергореактивности, к *Cladosporium* — 2,7 МЕ/мл (2 класс), к *Penicillium* — 0,67 МЕ/мл (1 класс), к *Aspergillus* сенсибилизация была обнаружена в концентрации 0,81 МЕ/мл, что соответствует 2 классу. В группе взрослых пациентов уровень IgE-антител к *Alternaria* выше 100,0 МЕ/мл не выявлен (рис. 3).

Выявление моно- и микст-сенсибилизации к аллергенам плесневых грибов в 2018–2019 гг. В 2018 г. в пробах большей части пациентов — 70,2% (85 из 121) — IgE-антитела к плесневым грибам выявлялись только к одному виду гриба, из них в I группе — 50,4% (n = 61), во II — 19,8% (n = 24). Чаще всего это были IgE-антитела к *Alternaria alternata*: из 85 проб они были определены в 78 (91,7%), из них в I группе обследованных — в 69,4% (n = 59), во II — в 22,3% (n = 19) (рис. 3).

У 25,6% (31 из 121) пациентов обнаружена сенсибилизация к двум плесневым грибам, из них в I группе — 18,2% (n = 22), во II — 7,4% (n = 9). Чаще всего это была ассоциация *Alternaria* с *Cladosporium*, она составила 83,8% (n = 26) от общего количества пациентов с сенсибилизацией к двум видам грибов, в I группе — 64,4% (n = 20), во II — 19,4% (n = 6).

У 4,2% (5 из 121) пациентов наблюдалась сенсибилизация к трем плесневым грибам: *Alternaria alternata* + *Cladosporium herbarum* + *Penicillium notatum*, из них в I группе — 2,5% (n = 3), во II — 1,7% (n = 2) от общего количества пациентов с сенсибилизацией (рис. 3).

В 2019 г. из 86 проб с IgE-антителами к плесневым грибам у большей части пациентов данные антитела выявлялись к одному виду (74,4%, n = 64), из них в I группе — 51,1% (n = 44), во II — 23,3% (n = 20). Чаще это были IgE к *Alternaria alternata*: из 86 проб они были определены у — 60,5% (n = 52) людей, из них в I группе — 43,0% (n = 37), во II — 17,5% (n = 15).

У 23,3% (n = 20) пациентов установлена сенсибилизация к двум плесневым грибам, из них в I группе — 12,8% (n = 11), во II — 0,5% (n = 9). Эта ассоциация была представлена грибами *Alternaria* и *Cladosporium* в 100% случаев у всех 20 пациентов с сенсибилизацией к двум грибам.

У 2,3% (n = 2) пациентов наблюдалась сенсибилизация к трем плесневым грибам: *Alternaria alternata* + *Cladosporium herbarum* + *Penicillium notatum*, из них в I группе — 1,15% (n = 1), во II — 1,15% (n = 1) от общего количества пациентов с сенсибилизацией (рис. 3).

Сравнение сенсибилизированных лиц к плесневым грибам по полу. В 2018 г. из 121 положитель-

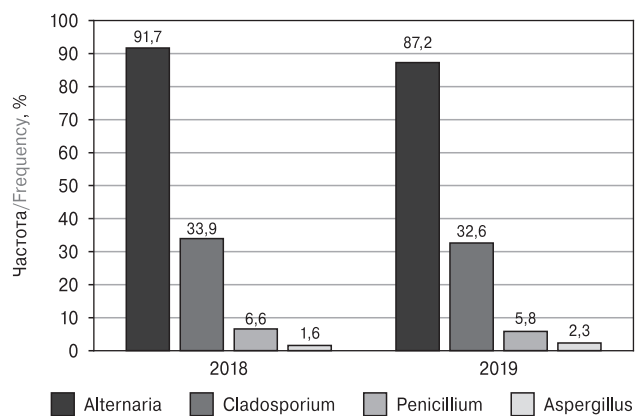


Рисунок 1. Общее количественное сравнение выявленной сенсибилизации к плесневым грибам за 2018 и 2019 гг. в группах детей и взрослых в целом (%)

Figure 1. General quantitative comparison of the detected sensitization to mold fungi found in 2018 and 2019 between children and adults (%)

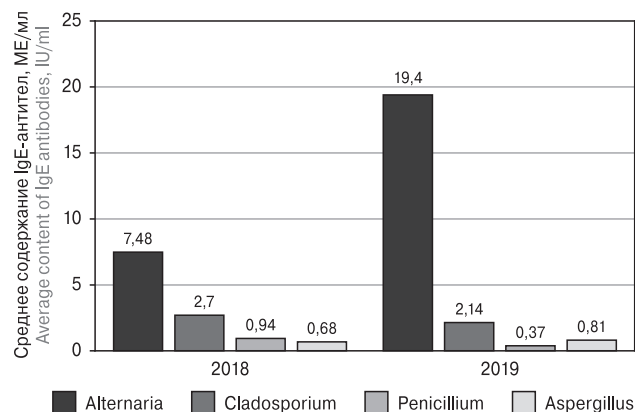


Рисунок 2. Среднее содержание IgE-антител (МЕ/мл) в сыворотке крови к плесневым грибам в группе детей в 2018 и 2019 гг.

Figure 2. 2018 and 2019 average level of serum IgE antibodies (МЕ/мл) to mold fungi in children

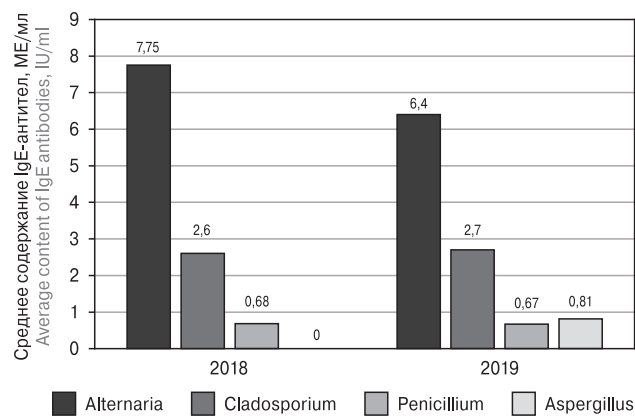


Рисунок 3. Среднее содержание IgE-антител (МЕ/мл) в сыворотке крови к плесневым грибам в группе взрослых в 2018 и 2019 гг.

Figure 3. 2018 and 2019 average level of serum IgE antibodies (МЕ/мл) to mold fungi in adults

ных образцов IgE-антитела к разным плесневым грибам немного чаще определялись у лиц женского пола — 53,7% (n = 65), из них девочек было — 75,3% (n = 49), женщин — 24,7% (n = 16).

В 2019 г. из 86 положительных образцов IgE-антитела к разным плесневым грибам немного чаще определялись у лиц мужского пола — 51,2% (n = 44), из них мальчиков было — 79,5% (n = 35), мужчин — 20,5% (n = 9).

Выводы

Полученные данные свидетельствуют о высокой распространенности лиц с IgE-антителами к некоторым плесневым грибам в Москве: в 2018 г. сенсибилизация к плесневым грибам была обнаружена у 25,3% (n = 121), а в 2019 г. — у 20,7% (n = 86) человек. Лидером по выявлению можно считать сенсибилизацию к плесневому

грибу *Alternaria alternata*, так как за два года из 207 положительных образцов она была определена в 186 пробах (89,9%) как моноинфекция, в 51 пробе (24,6%) — в ассоциации с *Cladosporium* и в 7 образцах (6,5%) — в ассоциации с *Cladosporium* и *Penicillium*. Сенсибилизация к плесневому грибу *Aspergillus fumigatus* встречалась крайне редко. При этом пол пациента роли не играл.

Специфические IgE-антитела в сыворотке крови к плесневым грибам чаще определялись у детей в возрасте до 17 лет. У них же чаще, чем у взрослых, обнаруживался исключительно высокий уровень IgE-антител в сыворотке крови к грибу *Alternaria alternata* в концентрации выше 100,0 МЕ/мл (n = 8 у детей против n = 1 у взрослых).

Все это следует учитывать при проведении комплекса лечебных мероприятий для данной категории пациентов.

Список литературы/References

1. Йоргенсон Дж.Х., Пфаллер М.А. Микробиологический справочник для клиницистов. М.: Мир, 2006. 243 с. [Jorgensen J.H., Pfaller M.A. Microbiological handbook for clinicians. Moscow: Mir, 2006. 243 p. (In Russ.)]
2. Колхир П.В. Доказательная аллергология-иммунология. М.: Практическая медицина, 2010. 528 с. [Kolkhir P.V. Evidence-based allergology-immunology. Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2010. 528 p. (In Russ.)]
3. Трушенко Н. Плесень и аллергия // Астма и аллергия. 2015. № 3. С. 23–24. [Trushchenko N. Mold and allergy. *Astma i allergiya = Asthma and Allergy*, 2015, no. 3, pp. 23–24. (In Russ.)]
4. Царев С.В. Аллергия к грибам: особенности клинических проявлений и диагностики // Астма и аллергия. 2015. № 3. С. 3–7. [Tsarev S.V. Allergy to mushrooms: features of clinical manifestations and diagnostics. *Astma i allergiya = Asthma and Allergy*, 2015, no. 3, pp. 3–6. (In Russ.)]

Авторы:

Метельская В.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия;
Матвеевская Н.С., к.б.н., старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия;
Гречишников О.Г., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия;
Сафронова А.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела планирования, координации НИР и информационно-аналитических исследований ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия.

Authors:

Metelskaya V.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology, G.N. Gabrichevsky Scientific Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Matveevskaya N.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Leading Researcher of the Laboratory of Immunobiological Preparations, G.N. Gabrichevsky Scientific Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Grechishnikova O.G., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratories of Clinical Microbiology and Biotechnology, G.N. Gabrichevsky Scientific Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Safroнова A.V., PhD (Medicine), Leading Researcher, Department of Planning, Coordination of Research Work and Information and Analytical Research, G.N. Gabrichevsky Scientific Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ. COVID-19 У РЕБЕНКА НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ ПОЧЕК

Ю.А. Ермолаева¹, Ю.Г. Самойлова¹, О.А. Олейник¹, Д.А. Кудлай²

¹ ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия

² ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Резюме. С момента распространения новой коронавирусной инфекции большинство исследователей отмечают низкий удельный вес детей среди заболевших по сравнению с взрослыми, легкое течение болезни и редкие осложнения в детской популяции. Наиболее частыми клиническими проявлениями являются респираторный и, несколько реже, диарейный синдромы. Течение заболевания имеет преимущественно легкий или бессимптомный характер. Риски неблагоприятных исходов у детей, как и у взрослых, четко коррелируют с наличием фоновой хронической патологии. Необходимость респираторной поддержки превалирует у детей с тяжелым преморбидным фоном. В данной статье рассмотрен клинический случай течения новой коронавирусной инфекции у подростка на фоне хронической патологии почек. В подростковом периоде у пациента диагностирован мезангиопролиферативный гломерулонефрит (IgA-нефропатия), по поводу которого ребенок находился на диспансерном учете и получал комбинированную терапию препаратами из групп ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента и дезагрегантов. В эпидемиологическом анамнезе фактов контакта с инфекционными больными не установлено. Клинические проявления COVID-19 у данного пациента представлены катаральным и диарейным синдромами, транзиторным нарушением функции почек в остром периоде заболевания. Дебют заболевания коронавирусной инфекции клинически характеризовался симптомами поражения желудочно-кишечного тракта и был расценен как острый гастроэнтерит инфекционной этиологии. Эмпирически назначенная антибактериальная терапия в комбинации с антиагрегантами и симптоматическими препаратами не имели эффекта. Подтверждение диагноза новой коронавирусной инфекции у пациента выполнено только на 4-й день госпитализации после появления клинико-лабораторных признаков поражения легких. Развившийся воспалительный процесс в легких пациента имел вторичный характер. Тяжесть состояния определялась наличием дыхательной и почечной недостаточности. Поражение легких при минимальной выраженности жалоб, клинических данных имело двухсторонний характер и потребовало респираторной поддержки. Комплексный подход в лечении, включающий респираторную, противовирусную, энтеросорбционную, антикоагуляционную, противовоспалительную, гипотензивную, гепатопротективную, симптоматическую терапию со сменой антибактериальных препаратов позволил добиться положительной динамики. На 12-й день болезни пациент не нуждался в респираторной поддержке. Наличие симптомов поражения желудочно-кишечного тракта при COVID-19 обуславливает необходимость обязательного включения ПЦР-теста на SARS-CoV-2 в стандарт диагностических мероприятий у пациентов с диарейным синдромом для этиологической расшифровки заболеваний.

Ключевые слова: COVID-19, новая коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2, дети, мультивоспалительный синдром.

Адрес для переписки:

Ермолаева Юлия Александровна
634050, Россия, Томск, Московский тракт, 4,
ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.
Тел.: 8 952 804-04-54 (моб.). Тел./факс: 8 (3822) 53-01-27.
E-mail: euassmu@yandex.ru

Contacts:

Yuliya A. Ermolaeva
634050, Russian Federation, Tomsk, Moskovsky trakt, 4,
Siberian State Medical University.
Phone: +7 952 804-04-54 (mob.). Phone/fax: +7 (3822) 53-01-27.
E-mail: euassmu@yandex.ru

Для цитирования:

Ермолаева Ю.А., Самойлова Ю.Г., Олейник О.А., Кудлай Д.А. Описание клинического случая. COVID-19 у ребенка на фоне хронической патологии почек // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 585–590. doi: 10.15789/2220-7619-TCC-1732

Citation:

Ermolaeva Yu.A., Samoilova Yu.G., Oleinik O.A., Kudlay D.A. The clinical case: COVID-19 in a child with chronic kidney disease // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 585–590. doi: 10.15789/2220-7619-TCC-1732

THE CLINICAL CASE: COVID-19 IN A CHILD WITH CHRONIC KIDNEY DISEASEErmolaeva Yu.A.^a, Samoilova Yu.G.^a, Oleinik O.A.^a, Kudlay D.A.^b^a Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation^b National Research Center — Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

Abstract. Since the spread of the novel coronavirus infection, most researchers have noted a low proportion of sick children in general pediatric cohort compared to adults, who had a mild disease course and rare complications. The most frequent clinical manifestations of the disease are respiratory and, some less frequently diarrheal syndromes. The disease has predominantly mild or asymptomatic course. The risk of adverse outcomes in children, similar to adults, clearly correlate with the presence of background chronic pathology. The need for respiratory support prevails in children with a severe pre-morbid burden. Here, a clinical case of ongoing novel coronavirus infection in adolescent patient comorbid with chronic kidney pathology is described. In adolescence, the patient was diagnosed with mesangioproliferative glomerulonephritis (IgA-nephropathy), and further registered at the dispensary receiving a combination therapy with angiotensin converting enzyme inhibitors and disaggregation drugs. The epidemiological history contained no established contacts with infectious patients. The clinical manifestations of COVID-19 in the patient are represented by catarrhal and diarrheal syndromes, transient renal dysfunction in the acute period of the disease. The onset of coronavirus infection was clinically characterized by symptoms of damaged gastrointestinal tract and was considered as acute gastroenteritis of infectious etiology. Empirically prescribed antibacterial therapy in combination with antiplatelet agents and symptomatic drugs had no effect. The diagnosis of the novel coronavirus infection was verified only on day 4 of hospitalization, clinical and laboratory signs of lung damage emerged. The inflammatory process developed in the patient lungs was secondary to the main pathology. The severity of the patient's condition was determined by the presence of respiratory and renal insufficiency. Lung damage with minimal severity complaints and clinical data had a bimodal pattern and required respiratory support. A comprehensive approach to treatment, including respiratory, antiviral, enterosorption, anticoagulation, anti-inflammatory, antihypertensive, hepatoprotective, symptomatic therapy with change in antibacterial drugs allowed to achieve positive dynamics. On day 12 of the illness, the patient required no respiratory support. The presence of symptoms of gastrointestinal tract damage in COVID-19 necessitates the mandatory inclusion of PCR assay for SARS-CoV-2 into diagnostic protocol in patients with diarrheal syndrome to perform etiological disease interpretation.

Key words: COVID-19, new coronavirus infection, SARS-CoV-2, children, pneumonia, kidney failure, gastroenteritis.

В начале пандемии COVID-19 высказывались предположения о невосприимчивости детей к SARS-CoV-2 [2, 3]. С момента старта распространения новой коронавирусной инфекции большинство исследователей отмечали низкий удельный вес детей среди заболевших по сравнению с взрослыми, легкое течение болезни и редкие осложнения в детской популяции [1]. Наиболее частыми клиническими проявлениями, по данным доступной литературы, являются респираторный и несколько реже диарейный синдромы. Течение заболевания имеет преимущественно легкий или бессимптомный характер. Риски неблагоприятных исходов у детей, как и у взрослых, четко коррелируют с наличием фоновой хронической патологии. Необходимость респираторной поддержки превалирует у детей с тяжелым преморбидным фоном.

В данной статье рассмотрен клинический случай течения новой коронавирусной инфекции у подростка на фоне хронической патологии почек.

Больной П., 17 лет. Из анамнеза жизни известно, что ребенок рос и развивался по возрасту, вакцинация проведена в соответствии с Национальным календарем профилактических прививок. Наследственность не отяго-

шена. ОРЗ болел 2–3 раза в год. Из детских инфекций перенес ветряную оспу. С 2017 г. по анализам мочи выявлена микрогематурия. В 2019 г. обследован в отделении нефрологии, диагноз: «Хронический нефритический синдром», ребенок поставлен на диспансерный учет у нефролога. В сентябре 2019 г. проведена нефробиопсия, морфологический диагноз: «Мезангиопролиферативный гломерулонефрит (IgA-нефропатия)», в качестве терапии назначены ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (эналаприл 5 мг 2 р/день), антиагреганты курсами (дипиридамолом).

Контакт с больными COVID-19 отрицал. Ребенок учится в школе, в 11 классе, карантин нет. В течение последнего месяца из г. Томска не выезжал.

Из анамнеза заболевания известно, что заболел остро 03.11.2020 с появления слабости, тошноты, рвоты, жидкого стула (1 раз). На 2-й день болезни появилась фебрильная температура, рвота участилась, сохранялся жидкий стул (1 раз). За медицинской помощью не обращался, принимал жаропонижающие *per os*, анальгин внутримышечно. На 3-й день болезни отмечены двукратный жидкий стул, рвота, постоянные позывы на рвоту, боли в животе, го-

ловокружение, слабость, гипертермия. Вызвана бригадой скорой медицинской помощи, доставлен в ОГАУЗ Детская больница № 1, госпитализирован в инфекционное отделение с диагнозом: «Острый инфекционный гастроэнтерит неуточненной этиологии средней степени тяжести». Сопутствующий диагноз: «Хронический нефритический синдром».

При поступлении больной предъявлял жалобы на рвоту 1–2 раза в сутки, жидкий стул 3 раза в день, повышение температуры до 39°C, слабость, недомогание, головокружение, появление кашля.

При объективном осмотре состояние больного было расценено как близкое к тяжелому за счет интоксикации, гастрита. Температура тела 37,1°C, ЧД 20/мин, ЧСС 80/мин, АД = 142/91 мм рт.ст., SpO₂ 98%. Менингеальные симптомы отрицательные. Постоянные позывы на рвоту. Сознание ясное. Больной предпочитал лежать, отмечалась резкая слабость и головокружение. Одышки не было. Катаральных проявлений не наблюдалось. Отеков, пастозности не выявлено. Тоны сердца ритмичные, тахикардия. Живот вздут, урчание по ходу тонкого кишечника, безболезненный. Кишечник пальпаторно не изменен. Печень, селезенка не увеличены. Стул с утра двукратно кашицеобразный, без патологических примесей, среднего объема.

В лечении при поступлении назначено: цефотаксим 1,5 г 2 раза в день в/м, аципол 1 кап 3 р/день, тримебутин 200 мг 3 р/день, эналаприл по 5 мг 2 р/день, инфузионная терапия глюкозо-солевыми растворами.

При проведении лабораторно-инструментального обследования получены следующие результаты.

В общеклиническом анализе крови от 05.11.2020 выявлены незначительные изменения, свидетельствующие о наличии бактериальной инфекции: WBC — $11,02 \times 10^9$ /л, RBC $5,1 \times 10^{12}$ /л, HCT 143 г/л, PLT 181×10^9 /л, нейтрофилы — 84%, лимфоциты — 11%, моноциты — 5%, СОЭ — 29 мм/ч.

Мочевой синдром по результатам общего анализа мочи от 06.11.2020 был представлен протеинурией, макрогематурией и гипостенурией: моча мутная, удельный вес 1010, белок 2,69 г/л, кетоны и глюкоза не обнаружены, цвет желтый, pH — 6,0; микроскопия: эритроциты — сплошь покрывают поле зрения, лейкоциты — единичные в поле зрения, соли — в небольшом количестве. В анализе мочи по Аддису–Каковскому от 06.11.2020: лейкоциты 3 150 000 000 кл/сут, эритроциты 198 000 000 кл/сут, белок 2,08 г/л.

В биохимическом анализе крови 06.11.2020 выявлены нарушения азотистого обмена, острофазная реакция воспаления: общий белок

63,1 г/л, глюкоза 6,0 мкмоль/л, общий билирубин 8 мкмоль/л, прямой 0,6 мкмоль/л, АЛТ 17,7 Ед/л, АСТ 24,9 Ед/л, хлор 101,1 ммоль/л, калий 4,05 ммоль/л, натрий 133,3 ммоль/л, кальций 2,08 ммоль/л, креатинин 195 мкмоль/л, мочевины 13,8 ммоль/л, альфа-амилаза 39 Ед/л, СРБ 161,1 мг/л.

Положительный результат проведенного анализа кала на скрытую кровь 09.11.2020 свидетельствовал о вовлечении в патологический процесс кишечной стенки.

С учетом жалоб ребенка на кашель и тяжесть состояния назначено рентгенологическое исследование органов грудной клетки для исключения воспаления легких. Рентгенография 06.11.2020: форма грудной клетки цилиндрическая. Легочной рисунок с обеих сторон усилен в прикорневых зонах. На этом фоне слева, в прикорневой зоне, на уровне среднего и нижнего легочных полей отмечается снижение пневматизации из-за локального сгущения легочного рисунка за счет перибронхиальных инфильтративных изменений. Корни легких: правый — структурен, не расширен, левый — умеренно расширен, малоструктурен за счет перибронхиальных изменений. Купола диафрагмы справа и слева с четкими ровными контурами. Боковые диафрагмальные синусы свободные. Сердечно-сосудистая тень расположена срединно, в поперечнике не расширена. Аорта — без особенностей. Заключение: рентгенографические признаки левосторонней полисегментарной (S4, S5 верхней доли? в S9, S10 нижней доли?) пневмонии. Рекомендован контроль в прямой и боковой проекции через 3–5 дней лечения.

На фоне проводимой терапии у пациента в клинике сохранялись диарейный синдром, интоксикация, гипертермия. Состояние ребенка ухудшилось за счет появления признаков дыхательной недостаточности (затруднения дыхания, одышки, падения сатурации). В динамике выполнена контрольная рентгенография органов грудной клетки 09.11.2020: по сравнению с предыдущей обзорной рентгенограммой № 5189 от 06.11.2020 — отрицательная динамика в виде появления новых очагов слева и справа; двусторонняя очагово-сливная пневмония: справа — S4, S5 средней доли и S8, S9 нижней доли, слева — S4, S5 верхней доли S8, S9, S10 нижней доли (рис. 1, 2, 3).

С учетом отрицательной динамики, ухудшения состояния больному на 4-й день госпитализации проведена коррекция лечения со сменной антибиотика на цефтриаксон и азитромицин (доза рассчитана по скорости клубочковой фильтрации), назначением ингибиторов протеаз (апротинин), антиагрегантов (дипиридамол), гормонотерапии (дексаметазон 24 мг/сут внутривенно, будесонид 3000 мг/сут ингаляционно).

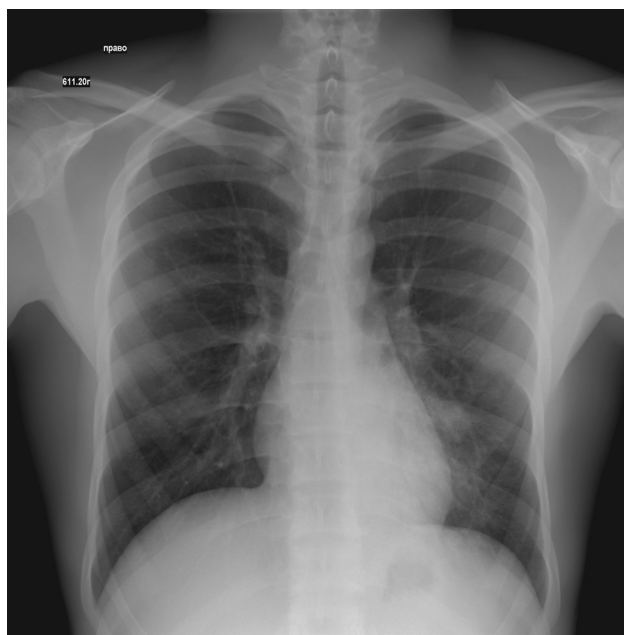


Рисунок 1. Рентгенологическое исследование легких в прямой проекции

Figure 1. Chest X-ray in direct projection

Согласно разработанным рекомендациям по обследованию больных с пневмонией в период пандемии COVID-19 ребенку проведено обследование на наличие SARS-CoV-2. 09.11.2020 получен положительный результат. Эффект от проводимой терапии не достигнут, состояние ухудшилось за счет появления и нарастания признаков дыхательной недостаточности. На 7-й день заболевания пациент был переведен в отделение реанимации и интенсивной терапии респираторного госпиталя ОГБУЗ Детская инфекционная больница им. Г.Е. Сибирцева с диагнозом: «Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (ПЦР+ от 09.11.2020) тяжелой степени. Острая внебольничная двухсторонняя очагово-сливная пневмония, ДН 1 степени. Острое поражение почек». Сопутствующий диагноз: «Хронический гломерулонефрит».

На момент перевода больной предъявлял жалобы на сухой кашель, затрудненное дыхание, повышение температуры до 39°C, рвоту, тошноту, жидкий стул. Объективно: температура тела 39,1°C, ЧД 30/мин, ЧСС 128/мин, при минимальной физнагрузке до 164/мин, АД 110/70 мм рт.ст. в покое, при нагрузке — 144/81 мм рт.ст., SpO₂ 95–96%. Состояние тяжелое за счет интоксикации, пневмонии, дыхательной и почечной недостаточности. Одышка смешанного характера, сухой приступообразный кашель. В легких ослабление дыхания, непостоянные мелкопузырчатые хрипы. Тоны сердца ритмичные, тахикардия. Живот мягкий, безболезненный. Кишечник пальпаторно не изменен. Печень, селезенка не увеличены. Стул 3 раза, жидкий.

Результаты параклинических исследований (общий анализ крови от 10.11.20): WBC 20,12 × 10⁹/л, HGB 139 г/л, PLT 295 × 10⁹/л, сегментоядерные нейтрофилы — 87%, палочкоядерные — 4%, юные — 2%, лимфоциты — 3%, моноциты — 4%, СОЭ — 37 мм, шизоциты — 0%, ретикулоциты — 0,3%. Данные показатели свидетельствовали о наличии бактериальной инфекции, что потребовало пересмотра антибактериальной терапии.

Существенных изменений на фоне проводимой терапии в системе гемостаза не выявлено, о чем свидетельствовали данные коагулограммы от 10.11.20: АЧТВ 35 с, ПТВ 16,5 с, ПТИ 97%, фибриноген 6,1 г/л.

Показатели биохимического анализа при поступлении были идентичны ранее проведенным, выраженная динамика с появлением синдрома цитолиза отмечена на 8-й день болезни. Биохимический анализ крови от 11.11.2020: общий белок 54,0 г/л, глюкоза 5,86 ммоль/л, общий билирубин 8,5 ммоль/л, прямой 0 ммоль/л, АЛТ 177 Ед/л, АСТ 156 Ед/л, хлор 102 ммоль/л, калий 4,54 ммоль/л, натрий 136,5 ммоль/л, кальций 2,35 ммоль/л, креатинин 141 ммоль/л, мочевины 14,5 ммоль/л, альфа-амилаза 15 Е/л, СРБ 24 мг/л, тимоловая проба 0,5 ЕД, ферритин 404,4 мг/л, тропонин 2,6 пг/мл.

С целью установления этиологического фактора поражения печени выполнено обследование на возможные причинные инфекционные агенты: ИФА на ВЭБ VCA IgM отриц., ЦМВИ IgM отриц., токсокароз IgG отриц., ВГА IgM отриц., HBs-Ag отриц., суммарные антитела на ВГС отриц. Отсутствие положительных результатов лабораторного исследования позволяет предположить токсический генез цитолиза.

Положительная динамика по восстановлению показателей азотистого обмена отмечена на 18-й день болезни. Биохимический анализ крови от 20.11.2020: общий белок 64,0 г/л, общий билирубин 7,2 ммоль/л, прямой 0 ммоль/л, АЛТ 135 Е/л, АСТ 40 Е/л, калий 4,44 ммоль/л, натрий 132,1 ммоль/л, креатинин 119 ммоль/л, мочевины 9,2 ммоль/л, тимоловая проба 1,7 ЕД.

Отрицательные результаты ПЦР-диагностики на выявление ДНК/РНК респираторных вирусов (парагриппа, аденовирусов, РС, коронавирусов сезонных, метапневмовирусов, бокавирусов, риновирусов), бакпосева мазка из зева на микрофлору, бакпосева кала на дизгруппу и условно-патогенную флору исключают другие инфекционные агенты в качестве причинного фактора респираторного заболевания у данного пациента.

На фоне лечения увлажненным кислородом через назальные катетеры в течение 3-х дней, антибактериальной (азитромицин 5 дней, це-

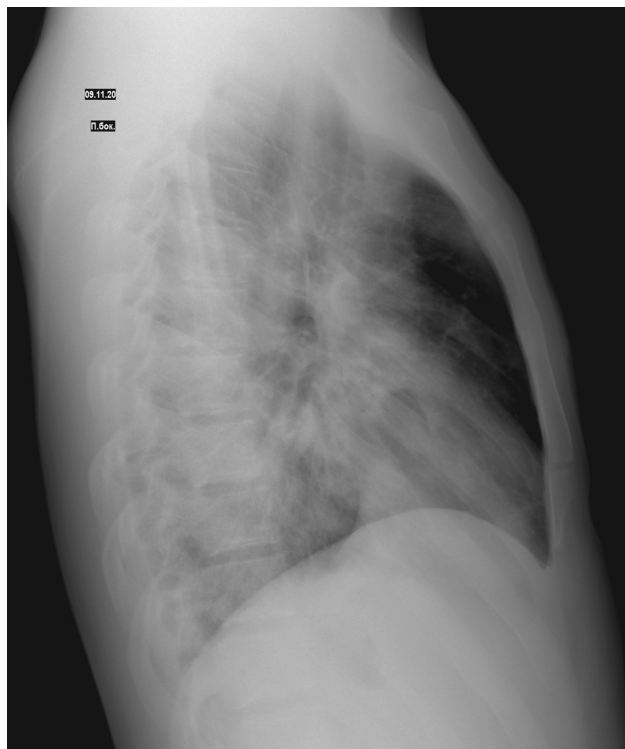


Рисунок 2. Рентгенологическое исследование легких в правой боковой проекции

Figure 2. Chest X-ray right lateral projection



Рисунок 3. Рентгенологическое исследование легких в левой боковой проекции

Figure 3. Chest X-ray left lateral projection

фепим 1,0 г/сут 10 дней), противовирусной (умифеновир, интерферон-альфа-2b интраназально), энтеросорбционной (смекта), антикоагуляционной (эноксапарин натрия), противовоспалительной (дексаметазон), гипотензивной (эналаприл 10 мг/сут), гепатопротективной (фосфолипиды) и симптоматической терапии отмечена положительная динамика. На 12-й день болезни пациент не нуждался в респираторной поддержке.

Контрольный анализ — ПЦР мазка из зева и носа на SARS-CoV-2 от 18.11.2020 — дал отрицательный результат.

На рентгенограмме органов грудной клетки в динамике от 16.11.2020 отмечена положительная динамика с признаками уменьшения инфильтрации легочной ткани.

На 21-й день болезни и 15-й день госпитализации больной переведен в нефрологическое отделение ОГАУЗ Детская больница № 1 для дальнейшего обследования и лечения по поводу патологии почек с заключительным диагнозом: «Острая внебольничная двухсторонняя очагово-сливная пневмония, S4, S5 средней доли и S8, S9 нижней доли справа, S4, S5 верхней доли S8, S9, S10 нижней доли слева, ДН I степени. Осложнение: «Острое поражение почек». Сопутствующий диагноз: «Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (ПЦР+ от 09.11.2020) тяжелой степени. Хронический

гломерулонефрит. Гепатит неуточненной этиологии (токсический?)».

При переводе больного клинически жалоб не было, сохранялся мочевого синдром в виде протеинурии и микрогематурии, умеренной гипертензии, а также незначительные нарушения азотистого обмена. После проведенного курса обследований и лечения в нефрологическом отделении в течении двух недель у больного нормализовались показатели артериального давления по результатам суточного мониторинга, восстановлена азотвыделительная функция почек, сохранились слабовыраженный мочевого синдром (протеинурия — 0,23 г/л, микрогематурия 4–8 в п/зр) и сниженная концентрационная способность почек.

Представленная выше история болезни наглядно демонстрирует многообразие клинических проявлений новой коронавирусной инфекции с преимущественным развитием респираторного и диарейного синдромов в детской популяции. У данного пациента дебют болезни проявился клиникой острой кишечной инфекции с последующим вовлечением дыхательной системы. Тяжесть течения заболевания определялась преморбидным фоном пациента. Признаки почечной недостаточности, появившиеся в первые дни болезни, были обусловлены сниженными компенсаторными возмож-

ностями пораженного органа и имели обратимый характер. Наличие симптомов поражения желудочно-кишечного тракта при COVID-19 обуславливает необходимость обязательного

включения ПЦР-теста на SARS-CoV-2 в стандарт диагностических мероприятий у пациентов с диарейным синдромом для этиологической расшифровки заболеваний.

Список литературы/References

1. ВОЗ. Технические руководящие указания. Наименование заболевания, вызванного коронавирусом (COVID-19), и вирусного возбудителя. [WHO. Technical guidelines. Name of disease caused by coronavirus (COVID-19) and viral agent]. URL: [https://www.who.int/ru/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/ru/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it) Lu X., Zhang L., Du H., Zhang J., Li Y.Y., Qu J., Zhang W., Wang Y., Bao S., Li Y., Wu C., Liu H., Liu D., Shao J., Peng X., Yang Y., Liu Z., Xiang Y., Zhang F., Silva R.M., Pinkerton K.E., Shen K., Xiao H., Xu S., Wong G.W.K.; Chinese Pediatric Novel Coronavirus Study Team. SARS-CoV-2 infection in children. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 382, no. 17, pp. 1663–1665. doi: 10.1056/NEJMc2005073
2. Заплатников А.Л., Свинцицкая В.И. COVID-19 и дети // Русский медицинский журнал. 2020. № 6. С. 20–22. [Zaplatnikov A.L., Svintsitskaya V.I. COVID-19 and children. *Russkij medicinskij zhurnal = Russian Medical Journal*, 2020, no. 6, pp. 20–22. (In Russ.)]
3. Особенности клинических проявления и лечение заболевания, вызванного новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) у детей: методические рекомендации. Версия 2 (03.07.2020). Министерство здравоохранения Российской Федерации. 73 с. [Features of clinical manifestations and treatment of the disease caused by a new coronavirus infection (COVID-19) in children: guidelines. Version 2 (07.03.2020). Ministry of Health of the Russian Federation. 73 p. (In Russ.)]. URL: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/050/914/original/03062020_%D0%B4%D0%B5%D1%82%D0%B8_COVID-19_v2.pdf

Авторы:

Ермолаева Ю.А., к.м.н., ассистент кафедры детских болезней ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;

Самойлова Ю.Г., д.м.н., профессор, зав. кафедрой детских болезней ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;

Олейник О.А., к.м.н., доцент кафедры детских болезней, эксперт Центра клинических исследований ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;

Кудлай Д.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины и молекулярной иммунологии ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия.

Authors:

Ermolaeva Yu.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Children's Diseases, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tomsk, Russian Federation;

Samoilova Yu.G., MD, PhD, Professor, Head of the Department of Children's Diseases, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tomsk, Russian Federation;

Oleynik O.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Children's Diseases, Expert of the Center for Clinical Research, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tomsk, Russian Federation;

Kudlay D.A., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Personalized Medicine and Molecular Immunology, NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 18.05.2021
Отправлена на доработку 31.10.2022
Принята к печати 06.05.2022

Received 18.05.2021
Revision received 31.10.2022
Accepted 06.05.2022

МЕСТНАЯ И ОБЩАЯ РЕАКЦИИ ПРИ ВВЕДЕНИИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ COVID-19

Н.Ю. Жеребцова¹, Т.В. Кайданек²

¹ ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород, Россия

² ФГАОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия

Резюме. Массовая вакцинация против новой коронавирусной инфекции, или COVID-19, требует динамической оценки побочных проявлений после иммунизации для их профилактики и определения тактики вакцинации различных групп населения. В статье представлено собственное клиническое наблюдение побочных проявлений, развившихся после введения второй дозы комбинированной векторной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V), у 48-летней пациентки, медицинского работника. Какие-либо реакции после введения первой дозы вакцинного препарата не наблюдались. После введения второй дозы вакцины появились общие реакции: слабость, недомогание, головная боль, снижение аппетита и тошнота, которые сохранялись в течение суток. Через 10 часов отмечены реакция в месте инъекции в виде гиперемии, отека до 1,5 см, резкой болезненности и зуда, сохранявшихся в течение первых суток. Через сутки присоединились гиперемия, отек, болезненность и сильный зуд рубца от вакцины БЦЖ, находящегося в 2 см от места введения вакцины. Постоянная ноющая боль и сильный зуд БЦЖ-рубца сохранялись в течение 3 недель, гиперемия и уплотнение — в течение 2 месяцев. Лечение проводилось антигистаминным препаратом лоратадин. Пациентка в течение жизни получала профилактические прививки соответственно возрасту и согласно календарю профилактических прививок; введение вакцинных препаратов переносила без каких-либо побочных проявлений. Сопутствующие заболевания на момент вакцинации: вазомоторный ринит, мочекаменная болезнь, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, сахарный диабет 2 типа в течение 5 лет, гипертоническая болезнь в течение 15 лет, индекс массы тела — 35,2. Пациентка постоянно принимает препараты галвус, сиофор, форсига, конкор. Аллергологический анамнез отягощен и проявляется крапивницей на препарат беродуал. Пациентка в течение двух лет находится в менопаузе, но через трое суток после введения второй дозы присоединилось дисфункциональное маточное кровотечение, которое продолжалось 5 дней. Также были отмечены ощущения «приливов», которые в менее выраженной форме наблюдались уже после введения первой дозы, но не были идентифицированы. Таким образом, качественная регистрация всех состояний, возникающих после введения вакцин против COVID-19, позволит выявить побочные проявления, связанные с вакцинацией, и выработать безопасную тактику иммунопрофилактики новой коронавирусной инфекции.

Ключевые слова: COVID-19, вакцина «Гам-КОВИД-Вак», побочные проявления после иммунизации, местная реакция, реакция БЦЖ-рубца, маточное кровотечение.

Адрес для переписки:

Жеребцова Надежда Юрьевна
308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, 85,
Белгородский государственный национальный
исследовательский университет.
Тел.: 8 (4722) 30-10-00.
E-mail: zherebtsova@bsu.edu.ru

Contacts:

Nadezhda Yu. Zherebtsova
308015, Russian Federation, Belgorod, Pobedy str., 85,
Belgorod State National Research University.
Phone: +7 (4722) 30-10-00.
E-mail: zherebtsova@bsu.edu.ru

Для цитирования:

Жеребцова Н.Ю., Кайданек Т.В. Местная и общая реакции при введении вакцины против COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 591–594. doi: 10.15789/2220-7619-LAS-1817

Citation:

Zherebtsova N.Yu., Kajdanek T.V. Local and systemic adverse reactions following COVID-19 vaccine // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 591–594. doi: 10.15789/2220-7619-LAS-1817

LOCAL AND SYSTEMIC ADVERSE REACTIONS FOLLOWING COVID-19 VACCINE**Zherebtsova N.Yu.^a, Kajdanek T.V.^b**^a *Belgorod National Research University, Belgorod, Russian Federation*^b *Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation*

Abstract. The mass vaccination against novel coronavirus infection (COVID-19) requires to dynamically evaluate risks of adverse events following immunization to prevent them and develop vaccination tactics for various population groups. We describe a clinical case of reaction following administration of the second dose of the heterologous recombinant adenovirus based COVID-19 vaccine Gam-COVID-Vac (Sputnik V) in 48-year-old female healthcare worker. No adverse events after administration of the first dose were recorded. After vaccination, the patient complained of weakness, malaise, headache, loss of appetite, and nausea that lasted for a single day. Reaction at the injection site appeared 10 hours after vaccination manifested as pruritic erythema, induration area up to 1.5 cm size, sharp pain, which resolved within 24 hours. On the second day post-vaccination, an inflammation area up to 1.5 cm size within the Bacillus Calmette–Guérin (BCG) scar site was noted and manifested as erythema, induration, painful to palpate, pruritus located 2 cm away from the injection site. BCG scar reaction with dull pain and severe pruritus lasted for three weeks. Erythema and induration at the BCG scar site resolved two months after the onset, which were resolved by using antihistaminic agent. The patient was vaccinated according to the Russian Federation Immunization Program, not associated with any adverse events following immunization. The patient had comorbidities such as vasomotor rhinitis, urolithiasis, stomach, duodenal ulcer, type 2 diabetes, arterial hypertension, and her body mass index of 35.2. The patient permanently receives antihypertensive and antihyperglycemic drugs, and has allergic reaction in the form of urticaria to Berodual. The patient has menopause during two years, but a five-day postmenopausal bleeding three days after vaccination with the second dose was noted. Thus, a high-quality surveillance of any local and systemic reactions associated with vaccination is needed to reveal adverse events to the vaccines against COVID-19 and elaborate a safe immunization program for preventing COVID-19.

Key words: COVID-19, vaccination, adverse events following immunization, local reaction, BCG scar reaction, postmenopausal bleeding.

Введение

В настоящее время в условиях широкого использования вакцин против новой коронавирусной инфекции (COVID-19) накопление информации о побочных проявлениях после иммунизации (ПППИ), их тщательное изучение и осмысление является одной из важных задач системы эпидемиологического надзора за указанной инфекцией. Появились первые публикации о ПППИ при использовании некоторых зарубежных вакцин против COVID-19. В описании результатов 3 фазы исследования вакцины «mRNA-1273» (Moderna, США) указано, что местные ПППИ встречались у 1,5% вакцинированных лиц. При этом они наблюдались в 84,2% случаев после введения первой и в 88,6% случаев после введения второй дозы вакцины. Ведущей жалобой у вакцинированных лиц была болезненность в месте инъекции, а также эритема и отек [2]. В другой статье, посвященной вакцине «mRNA-1273» (Moderna, США), местные ПППИ описаны у 12 человек. Они проявлялись в виде болезненности, гиперемии, локального повышения температуры, уплотнения и зуда, возникшие после введения, как первой, так и второй дозы в различные сроки: сразу после инъекции и на 4–11 дни. Симптомы сохранялись в течение 2–11 дней; у 5 пациентов отек и гиперемия были более 10 см в диаметре. При введении второй инъекции местные ПППИ появлялись на 2-й день, после первой

дозы — на 8-й день [3]. Еще один феномен — воспалительная реакция рубца после Bacillus Calmette–Guérin (BCG) вакцины был описан у двух человек, получивших вторую дозу мРНК вакцин против COVID-19 [«BNT162b2» (Pfizer, США) и «mRNA-1273» (Moderna, США)] [6].

Приводим собственное наблюдение поствакцинального периода после введения комбинированной векторной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник-V), проявившегося в виде общей и местной реакций, классифицированных в соответствии с «Методическими рекомендациями по выявлению, расследованию и профилактике побочных проявлений после иммунизации» Министерства здравоохранения Российской Федерации 2019 г., как несерьезные (незначительные) ПППИ.

Пациентка 48 лет, медицинский работник. Из анамнестических данных известно, что в течение жизни получала профилактические прививки соответственно возрасту и согласно календарю профилактических прививок; введение вакцинных препаратов переносила без каких-либо ПППИ как общего, так и местного характера. Сопутствующие заболевания: вазомоторный ринит, мочекаменная болезнь, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, сахарный диабет 2 типа в течение 5 лет, гипертоническая болезнь в течение 15 лет, по поводу которых пациентка постоянно принимает препараты галвус, сиофор, форсига, конкор, периодически — ингибиторы протон-

ной помпы, де-нол, лоратадин. Индекс массы тела составляет 35,2. Аллергологический анамнез отягощен и проявляется развитием коллаптоидной реакции на препарат гемодез, впервые возникшей более 30 лет назад, и крапивницы на препарат беродуал, наблюдаемой в течение последних трех лет.

Пациентке была введена первая доза вакцины «Гам-КОВИД-Вак» 02.04.2021 в левое плечо, никаких местных и общих реакций, указанных в инструкции к препарату, в течение всего периода наблюдения не выявлено; однако сама пациентка отметила появившиеся ощущения в виде «приливов», частота которых не вызвала у нее беспокойства, — данная жалоба была расценена как общая реакция. Вторая доза была введена так же в левое плечо утром 23.04.2021 и к вечеру того же дня (через 10 часов) на месте инъекции появились болезненность, отек и гиперемия диаметром 1,5 см, сильный зуд. На левом плече пациентки при осмотре визуализировались 3 рубчика после вакцинации БЦЖ, вакцина «Гам-КОВИД-Вак» была введена в 2 см от среднего рубчика, который 24.04.2021 (через сутки после введения второй дозы вакцины) стал отечным, появились уплотнение до 1,5 см, гиперемия, болезненность и сильный зуд, при этом отек и эритема вокруг места инъекции прошли.

Из общих реакций в день введения 2-й дозы вакцинного препарата наблюдались слабость, недомогание, головная боль, снижение аппетита и тошнота. В последующие дни общие реакции не проявлялись.

25.04.2021 в дневнике самонаблюдения на портале «Госуслуга» пациенткой были отмечены пункты «общие жалобы» и «местные признаки».

Пациентка самостоятельно принимала антигистаминный препарат лоратадин (10 мг 1 раз в день). К терапевту обратилась 30.04.2021, на 7-й день после введения второй дозы, из-за сохраняющегося сильного зуда левого плеча и боли в области рубца (рис. 1, III обложка). Врачом терапевтом был поставлен диагноз «кожный зуд неуточненного генеза на фоне декомпенсации сахарного диабета», рекомендовано продолжить прием лоратадина, дополнительно назначены полисорб и хофитол.

Уплотнение и гиперемия БЦЖ-рубца, постоянная ноющая боль и сильный зуд сохранялись в течение 3-х недель. При осмотре 30.06.2021 у пациентки отмечены гиперемия и уплотнение рубца (рис. 2, III обложка).

Рубец после вакцинации БЦЖ является гранулемой, образованной эпителиоидными гистиоцитами, фибробластами, клетками Лангерганса и другими иммунными клетками, опосредующими гиперчувствительность замедленного типа [8]. Феномен воспалительной реакции в месте рубца от вакцины БЦЖ описан для синдро-

ма Kawasaki у детей [10], при инфекционных заболеваниях, таких как корь [9] и герпесвирусная инфекция 6 типа [5], при вакцинации против гриппа [4] и без какой-либо явной причины [1]. Можно предположить, что в перечисленных случаях иммунный ответ организма на различные антигены послужил неспецифическим фактором для реактивации иммунных клеток, составляющих гранулему рубцовой ткани на месте введения вакцины БЦЖ. Данный феномен описан и у пациентов с иммунодефицитами, например, при ВИЧ-инфекции и после трансплантации печени [8], что предполагает возможность влияния на реактивацию БЦЖ-рубца различных состояний иммунной системы, в том числе вакцин от новой коронавирусной инфекции.

В нашем случае анамнез жизни и настоящий статус пациентки указывают на аллергическую настроенность организма в целом. Можно предположить, что после введения первой дозы вакцины произошла сенсibilизация, и развитие реакции на вторую дозу явилось проявлением сформировавшейся гиперчувствительности с сохранением довольно длительной реакции в месте введения препарата.

Пациентка в течение двух лет находится в менопаузе, тем не менее на 3-й день после введения второй дозы вакцины у нее начались кровянистые выделения из половых путей, которые продолжались в течение 5 дней. Пациентка также отметила появившееся ощущение «приливов», которые, как было уже сказано, имели место в менее выраженной форме уже после введения первой дозы, но серьезного беспокойства не вызвали (общая реакция). При обращении к врачу-гинекологу был выставлен диагноз «Дисфункциональное маточное кровотечение в постменопаузальном периоде» и исключены другие причины маточного кровотечения.

Возникновение у женщин разных возрастов в поствакцинальном периоде нарушений менструального цикла (метроррагии), усиление кровотечений (полименорея) и появление маточных кровотечений у женщин, находящихся в периоде менопаузы, описаны после вакцинации препаратами AstraZeneca и Pfizer [7], что свидетельствует о уже зафиксированных фактах подобных состояний при применении вакцинных препаратов от новой коронавирусной инфекции. Указанное, безусловно, должно привлечь внимание специалистов различного медицинского профиля на основе интеграционных подходов для поиска ответа по патогенетическим механизмам и методам коррекции указанных состояний.

Описанный клинический случай ПППИ после применения вакцины против COVID-19 — реакция БЦЖ-рубца и развитие дисфункционального маточного кровотечения в пост-

менопаузальном периоде, вызывает интерес с позиции приобретения медицинскими работниками клинического опыта понимания вероятности возникновения и продолжительности таких состояний, принятия решения по минимизации симптомов и психологической комфортности самого пациента.

Таким образом, для того, чтобы выявить все возможные ПППИ, возникающие при введении вакцин против COVID-19, необходимо

регистрировать любые изменения состояния здоровья, возникающие в течение месяца после введения каждой дозы препарата. Качественная регистрация ПППИ и определение частоты их встречаемости необходимы для оценки безопасности иммунобиологических препаратов, своевременной актуализации информации, содержащейся в регистрационной документации, и определения тактики иммунизации лиц с различными преморбидными состояниями.

Список литературы/References

1. Ayantunde A.A. Delayed BCG granulomatous reaction in an immunocompetent adult: a case report. *Clinical Practice*, 2012, vol. 1, no. 1, pp. 1–3. doi: 10.5923/j.cp.20120101.01
2. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., Diemert D., Spector S.A., Roupael N., Creech C.B., McGettigan J., Kehtan S., Segall N., Solis J., Broz A., Fierro C., Schwartz H., Neuzil K., Corey L., Gilbert P., Janes H., Follmann D., Marovich M., Masciola J., Polakowski L., Ledgerwood J., Graham B.S., Bennett H., Pajon R., Knightly C., Leav B., Deng W., Zhou H., Han S., Ivarsson M., Miller J., Zaks T. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2021, vol. 384, pp. 403–416. doi: 10.1056/NEJMoa2035389
3. Blumenthal K.G., Freeman E.E., Saff R.R., Robinson L.B., Wolfson A.R., Foreman R.K. Delayed large local reactions to mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.*, 2021, vol. 384, no. 13, pp. 1273–1277. doi: 10.1056/NEJMc2102131
4. Chavarri-Guerra Y., Soto-Perez-de-Celis E. Erythema at the bacillus Calmette–Guerin scar after influenza vaccination. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2019, vol. 53: e20190390. doi: 10.1590/0037-8682-0390-2019
5. Kakisaka Y., Ohara T., Katayama S., Suzuki T., Sasai S., Hino-Fukuyo N., Kure S. Human herpes virus type 6 can cause skin lesions at the BCG inoculation site similar to Kawasaki disease. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2012, vol. 228, no. 4, pp. 351–353. doi: 10.1620/tjem.228.351
6. Lopatynsky-Reyes E.Z., Acosta-Lazo H., Ulloa-Gutierrez R., Ávila-Aguero M.L., Chacon-Cruz E. BCG scar local skin inflammation as a novel reaction following mRNA COVID-19 vaccines in two international healthcare workers. *Cureus*, 2021, vol. 13, no. 4: e14453. doi: 10.7759/cureus.14453
7. Merchant H. Rapid response: COVID-19 post-vaccine menorrhagia, metrorrhagia or postmenopausal bleeding and potential risk of vaccine-induced thrombocytopenia in women. *BMJ*, 2021, vol. 373: n958. doi: 10.1136/bmj.n958
8. Moreira T.N.F., Moraes-Pinto M.I., Costa-Carvalho B.T., Grumach A.S., Weckx L.Y. Clinical management of localized BCG adverse events in children. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 2016, vol. 58, no. 84. doi: 10.1590/S1678-9946201658084
9. Muthuvelu S., Lim K.S.-C., Huang L.-Y., Chin S.-T., Mohan A. Measles infection causing Bacillus Calmette–Guerin reactivation: a case report. *BMC Pediatrics*, 2019, vol. 19, no. 1: 251. doi: 10.1186/s12887-019-1635-z
10. Yamazaki-Nakashimada M.A., Unzueta A., Gámez-González L.B., González-Saldaña N., Sorensen R.U. BCG: a vaccine with multiple faces. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2020, vol. 16, no. 8, pp. 1841–1850. doi: 10.1080/21645515.2019.1706930

Авторы:

Жеребцова Н.Ю., к.м.н., доцент, зав. кафедрой гигиены и эпидемиологии медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета, г. Белгород, Россия;

Кайданек Т.В., к.м.н., доцент, доцент кафедры эпидемиологии Башкирского государственного медицинского университета, г. Уфа, Россия.

Authors:

Zherebtsova N.Yu., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Hygiene and Epidemiology, Institute of Medicine of Belgorod National Research University, Belgorod, Russian Federation;

Kajdanek T.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation.

Поступила в редакцию 09.11.2021
Принята к печати 06.05.2022

Received 09.11.2021
Accepted 06.05.2022

К 70-ЛЕТИЮ ВИТАЛИЯ ВАСИЛЬЕВИЧА ЗВЕРЕВА



Виталий Васильевич Зверев — академик РАН, доктор биологических наук, профессор, научный руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии им академика А.И. Воробьева Института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовского Университета), Минздрава России, лауреат двух премий Правительства Российской Федерации в области науки и техники.

В.В. Зверев — один из ведущих ученых нашей страны в области вирусологии, вакцинологии, молекулярной биологии, генетики вирусов, биологической безопасности, прекрасный организатор медицинской науки, опытный педагог и воспитатель научных кадров.

После окончания в 1975 г. лечебного факультета Волгоградского государственного медицинского института трудовую деятельность Виталий Васильевич начал в должности младшего научного сотрудника в Научно-исследовательском институте прикладной микробиологии Главмикробиопрома в г. Оболенске Московской области (1975–1979 гг.) и в Институте молекулярной генетики АН СССР (1979–1985 гг.). В 1985 г. Виталий Васильевич успешно защитил кандидатскую диссертацию по теме «Особенности репликации и структуры ДНК малых колициногенных плазмид».

Последующая научная деятельность В.В. Зверева связана с Научно-исследовательским институтом вирусных препаратов РАМН, где он прошел путь от старшего научного сотрудника до директора института. Фундаментальные научные исследования В.В. Зверева посвящены изучению механизмов взаимодействия вирусов с клеткой, изучению молекулярно-биологической структуры и регуляции экспрессии генов рецепторов вирусов, структуры и функции вирусных белков. Результаты научных исследований были обобщены в докторской диссертации «Структура гена CD4-рецептора и изучение антивирусного действия рекомбинантных форм CD4», защищенной в 1995 г.

В 1999 г. он был избран членом-корреспондентом РАМН, в 2002 г. — академиком РАМН. С 1997 по 2006 г. В.В. Зверев возглавлял Научно-исследовательский институт вирусных препаратов РАМН, а после реорганизации Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова в форме присоединения к нему Института вирусных препаратов им. О.Г. Анджaparидзе возглавлял до 2018 г. ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. С 2018 г. по настоящее время В.В. Зверев — научный руководитель Института.

В.В. Зверев — автор более 400 научных трудов, из них 17 книг и монографий, 18 авторских свидетельств и патентов, 12 учебников и 4 методических рекомендаций. Под его руководством и при научном консультировании выполнены и успешно защищены 4 докторских и 10 кандидатских диссертаций.

Большое внимание в своей научной работе В.В. Зверев уделяет прикладным аспектам медицинской науки. Целый ряд его исследований посвящен приоритетным разработкам в области биотехнологии. Под его руководством и при непосредственном участии разработано и внедрено в практику отечественного здравоохранения 26 диагностических и противовирусных препаратов.

В.В. Зверев один из авторов первой национальной программы борьбы против ВИЧ-инфекции. При его непосредственном участии Институт первым в 1985 г. начал интенсивные исследования по созданию СПИД-диагностикума, и уже к середине 1986 г. были созданы и внедрены в практику здравоохранения первые отечественные тест-системы для скрининга и подтверждения ВИЧ-инфекции. За цикл работ «Разработка и организация производства новых высокоэффективных средств диагностики ВИЧ-инфекции и гепатитов А, В, С» в 1998 г. В.В. Звереву присуждена премия Правительства Российской Федерации в области науки и техники.

За цикл работ «Разработка, научное обоснование и внедрение системы защиты населения Российской Федерации от новых биологических угроз» в 2006 г. присуждена вторая премия Правительства Российской Федерации в области науки и техники (2006 г.).

Академик РАН В.В. Зверев активно участвует в работе Российской академии наук, входит в состав Президиума РАН. В.В. Зверев проводит большую научно-организационную работу. Он является заместителем председателя Всероссийского научно-практического общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов; председателем научного совета по комплексной проблеме медицины «Вакцинология»; председателем проблемной комиссии «Корь, паротит, краснуха»; главным редактором журнала «Микробиология, эпидемиология и иммунобиология»; членом редакционной коллегии журнала «Вопросы вирусологии», председателем диссертационного совета Института, членом экспертного совета GAVI, членом Правительственной комиссии по биологической и химической безопасности.

В.В. Зверев большое значение придает организации научно-методической и практической помощи учреждениям здравоохранения и населению. Успешно осуществляется деятельность консультативно-поликлинического отделения Института, специалисты которого оказывают высококвалифицированную медицинскую помощь жителям Москвы и Московского региона, и которое является, в первую очередь, базой для научных исследований и внедрения новых технологий в практику здравоохранения.

В настоящее время научные исследования, руководимые академиком РАН В.В. Зверевым, посвящены важнейшим приоритетным направлениям современной медицины — изучению клеточных и молекулярных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета при бактериальных и вирусных инфекциях, совершенствованию национального календаря прививок РФ и созданию отечественных вакцинных препаратов, разработке и усовершенствованию методов диагностики (в том числе экспресс-диагностики) и мониторинга патологий различной этиологии, а также созданию иммунобиологических препаратов против наиболее распространенных инфекционных заболеваний.

Виталий Васильевич принимает активное участие в разработке иммунотерапевтического подхода, основанного на использовании вакцинных штаммов вирусов в качестве онколитических агентов для элиминации опухолевых клеток, в исследованиях по совершенствованию методов молекулярной диагностики и экологического мониторинга вирусных инфекций, разработке технологий получения вакцины против вирусов группы герпеса, а также ассоциированной вакцины против кори, паротита, краснухи и ветряной оспы. В круг научных интересов В.В. Зверева входят исследования по оценке профилактической и терапевтической эффективности противовирусных препаратов, разработке экспериментальных моделей для изучения эффективности препаратов.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://iimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

Основные виды статей, публикуемых в журнале

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их включения в текст статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка в отдельный файл. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
 - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
 - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
 - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
 - полное название статьи, направляемой в редакцию;
 - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
 - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
 - дата отправления работы.
 - 2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»).

- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
 - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
- 6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
- 7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
- 8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий, редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы www.e-library.ru . DOI статьи приводится в квадратных скобках после URL-адреса

4. Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://iimmun.ru>) в рубрике «Рецензирование» раздела «О журнале».

**Вы можете оформить подписку на журнал
 «Инфекция и иммунитет» через отделения связи:
 ООО «Урал-Пресс-Округ» и электронный каталог «Российская периодика»
 в сети Internet на сайте www.arpk.org.
 Подписной индекс 41392.
 Подписка на электронную версию журнала
 на сайте www.elibrary.ru**

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агеев В.А.	450	Катаева Л.В.	563	Сенатская А.О.	461
Агеев И.В.	450	Киселева В.В.	569	Сидоренко С.В.	450
Арзуманян В.Г.	519	Колотова О.Н.	563	Смольникова М.В.	543
Арипов В.С.	427	Колыганова Т.И.	519	Соболева Е.А.	461
Афридонова З.Э.	495	Конаныхина С.Ю.	519	Степанова К.Б.	563
Базыкина Е.А.	535	Кудлай Д.А.	439, 585	Степанова Т.Ф.	563
Бакштановская И.В.	563	Кудрявцев И.В.	409	Терещенко С.Ю.	543
Баловнева М.В.	527	Кулова Е.А.	461	Тихонова М.А.	475
Белякова А.В.	527	Курашова С.С.	527	Ткаченко Е.А.	527
Бондаренко А.П.	535	Кутлугужина Ф.Г.	527	Ткаченко П.Е.	527
Брызгалова Д.А.	461	Леплина О.Ю.	475	Топтыгина А.П.	495
Вольных Э.В.	527	Лесник Э.В.	486	Тотоян Арег А.	409
Гарбуз Ю.А.	535	Малинчик М.А.	543	Троценко О.Е.	535
Гинда С.С.	486	Матвеевская Н.С.	580	Труфанова А.А.	505
Годвалов А.П.	575	Меледина И.В.	475	Уткин О.В.	461
Головкин А.С.	409	Метельская В.А.	580	Филатова Е.Н.	461
Гречишников О.Г.	580	Морозов В.Г.	527	Филиппенко А.В.	505
Дзагурова Т.К.	527	Морозов И.А.	575	Чемисова О.С.	505
Докторова Н.П.	439	Мурзабаева Р.Т.	527	Черных Е.Р.	475
Ермолаева Ю.А.	585	Носков А.К.	505	Чишагорова И.В.	535
Желтова О.И.	475	Огиенко О.Н.	535	Шевела Е.Я.	475
Жеребцова Н.Ю.	591	Олейник О.А.	585	Шестопапов А.М.	427
Зайцева Т.А. (Москва)	519	Омельченко Н.Д.	505	Шмыленко В.А.	535
Зайцева Т.А. (Хабаровск)	535	Останин А.А.	475	Юдина С.М.	569
Закиров Р.Ш.	495	Попкова М.И.	461	Behzadmehr R.	551
Зверев В.В.	519	Пшеничная Н.Ю.	535	Boskabadi H.	556
Иванова А.В.	427	Русанова Т.С.	569	Estabraghnia Babaki H.	511
Иванова И.А. (Ростов-на-Дону)	505	Самойлова П.В.	519	Hassani Azad M.	511
Иванова И.А. (Курск)	569	Самойлова Ю.Г.	585	Najafi-Asl M.	511
Ишмухаметов А.А.	527	Сафронова А.В.	580	Nejadkehkh A.	551
Казачинская Е.И.	427	Сахарнов Н.А.	461	Norouzi M.	511
Кайданек Т.В.	591	Свитич О.А.	519	Rakhshanizadeh F.	556
Карпунина Т.И.	575	Семикина Е.Л.	495	Sharifi-Sarasiabi K.	511
				Zakerihamidi M.	556

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аллерген туберкулезный	439	микроорганизмы	575	фоликулярные Т-хелперы	409
рекомбинантный	439	множественная резистентность	450	хламидийная инфекция	527
аллергическая реакция	580	мобильные генетические элементы	450	хемилюминесценция	575
антимикробная активность	519	моноклональные антитела	569	циркулирующие иммунные	
антитела	495	мультивоспалительный синдром	585	комплексы	486
арктические популяции	543	натуральные киллеры	505	цитотоксические лимфоциты	505
атопическая сенсibilизация	580	непрямой метод		чувствительность к антимикробным	
бактериальная флора	535	иммунофлюоресценции	527	препаратам	563
бета-лактамазы	563	новая коронавирусная инфекция	585	эндогенная интоксикация	486
биотехнологическая платформа	439	новорожденные	543	эпидемиология	427, 450
больничная среда	535	одноййцевые близнецы	569	этиология	427
вакцина «Гам-КОВИД-Вак»	591	особенности течения	569	adiponectin	511
ВГЧ-6А	461	особо опасные инфекции	427	Argar score	556
ВГЧ-6В	461	плесневые грибы	580	<i>Candida albicans</i>	519
вирус Ласса	427	пневмония	563	CD8 ⁺ -лимфоциты	495
вирусный цирроз печени	475	побочные проявления после		CFP-10	439
внебольничная пневмония	535	иммунизации	591	COVID-19	409, 495, 505, 511, 563, 569, 585, 591
ВЭБ-1	461	полиморфизм	543	cross-sectional studies	551
ВЭБ-2	461	популяции и субпопуляции		C-Tb	439
геморрагическая лихорадка		лимфоцитов	505	disease severity	511
с почечным синдромом	527	прогноз	475	ESAT-6	439
генотипирование	461	путресцин	575	fetal membranes	556
гибридный патотип	450	ПЦР	461	IGRA-тесты	439
гидроксильные радикалы	575	ранняя специфическая диагностика	527	IL-6	511
гипервирулентность	450	распространенность	580	intensive care unit	511
грудное молоко	519	реакция БЦЖ-рубца	591	interferon-gamma release assays	439
дети	585	рекомбинантный белок		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	563
дифференциальная детекция	461	ESAT-6—CFP-10	439	<i>Klebsiella</i> sp.	450
иммуноблот	580	риск инфицирования	535	lung involvement	511
иммуноглобулин	519	Россия	543	MASP2	543
кадаверин	575	слюна	461	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	439
клеточный иммунитет	495	специфические IgE-антитела	580	newborn	556
клиническая картина		субклассы IgG	495	prolonged premature rupture	
лихорадка Ласса	427	субпопуляции моноцитов	475	of membranes	556
клинический случай	569	субпопуляции Т-хелперов 17	409	radiography	551
лактоферрин	519	сывороточный альбумин	519	ROC-анализ	475
лейкоциты	575	Т-лимфоциты	505	SARS-CoV-2	495, 585
лейтинный путь	543	туберкулез	486	sputum	551
лечение COVID-19	569	Т-хелперы	409	T-SPOT.TB	439
лихорадка Ласса	427	Т-хелперы 1	409	tuberculosis	551
ЛПУ	535	Т-хелперы 2	409	vitamin D	556
маточное кровотечение	591	тяжесть заболевания	475	X-ray	551
местная реакция	591	факторы резистентности	563		

Иллюстрация к статье «Вклад лактоферрина, сывороточного альбумина и секреторного иммуноглобулина класса А в активную активность сыворотки грудного молока» (авторы: В.Г. Арзуманян, Т.И. Колыганова, О.А. Свитич, П.В. Самойликов, С.Ю. Конаныхина, Т.А. Зайцева, В.В. Зверев) (с. 519–526)

Illustration for the article “An impact of lactoferrin, serum albumin and secretory immunoglobulin A in antimicrobial activity of breast milk whey” (authors: Arzumanyan V.G., Kolyganova T.I., Svitich O.A., Samoilikov P.V., Konanykhina S.Yu., Zaytseva T.A., Zverev V.V.) (pp. 519–526)

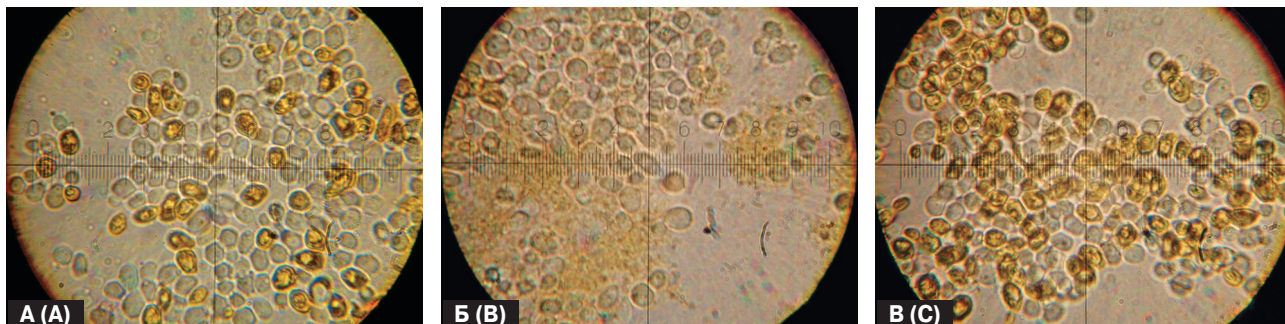


Рисунок 1. Микроскопия клеток *C. albicans*

Figure 1. Microscopy of *C. albicans* cells

Примечание. А — контроль — 2 ч инкубации с физраствором; Б — 2 часа инкубации с сывороткой грудного молока; В — 2 часа инкубации с фракцией сыворотки ниже 100 kDa. Желтые клетки — мертвые, белые — живые (увеличение микроскопа $\times 1750$).

Note. A — control — 2 h incubation with saline; B — 2 h incubation with breast milk serum; C — 2 h incubation with a serum fraction below 100 kDa. Dead and live cells are highlighted in yellow and white, respectively (microscope magnification $\times 1750$).

Иллюстрации к статье «Местная и общая реакции при введении вакцины против COVID-19» (авторы: Н.Ю. Жеребцова, Т.В. Кайданек) (с. 591–594)

Illustrations for the article “Local and systemic adverse reactions following COVID-19 vaccine” (authors: Zherebtsova N.Yu., Kajdanek T.V.) (pp. 591–594)



Рисунок 1. Воспалительная реакция среднего БЦЖ-рубца на 7-й день после введения второй дозы вакцины «Гам-КОВИД-Вак»

Figure 1. Inflammation of the intermediate BCG scar on the 7th day after receiving the second dose of COVID-19 vaccine “Gam-COVID-Vac”



Рисунок 2. Остаточные проявления воспалительной реакции среднего БЦЖ-рубца через 10 недель после введения второй дозы вакцины «Гам-КОВИД-Вак»

Figure 2. Residual effects of inflammation of the intermediate BCG scar in 10 weeks after receiving the second dose of COVID-19 vaccine “Gam-COVID-Vac”

Подписной индекс:
Урал-Пресс – 41392

