

2022



ИНФЕКЦИЯ
И
ИММУНИТЕТ



Санкт-Петербургское региональное
отделение Всероссийской Общественной
Организации – Ассоциации
Аллергологов и Клинических
Иммунологов

**XVII ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. ИОФФЕ**

ДНИ ИММУНОЛОГИИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

22 – 25 мая 2023 года

Основные даты:

1 марта – срок подачи тезисов
1 апреля – ранняя регистрация
1 апреля – бронирование гостиницы

ОРГАНИЗАТОРЫ ФОРУМА:

Министерство здравоохранения РФ
Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека
Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера
Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова
Институт экспериментальной медицины
Всероссийское научно-практическое общество
эпидемиологов, микробиологов и паразитологов

Российская Академия Наук
Комитет по науке и высшей школе
Правительства Санкт-Петербурга
Комитет по здравоохранению Правительства
Санкт-Петербурга
Российская Ассоциация Аллергологов
и Клинических Иммунологов
Российское научное общество Иммунологов
Ассоциация специалистов
и организаций лабораторной службы
«Федерация лабораторной медицины»

КОНТАКТЫ:

**Председатель СПб РО РААКИ,
д.м.н., профессор, академик РАН Тотолян Арег Артемович**
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
Тел.: (812) 232-00-66, e-mail: totolian@spbraaci.ru

Секретариат:

Ракитянская Наталья Владимировна
Тел./факс: (812) 233-08-58,
e-mail: imdays@spbraaci.ru

АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:
197101, Санкт-Петербург, а/я 130,
СПб РО РААКИ

www.immundays.spbraaci.ru



ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

ноябрь–декабрь

2022, том 12

№ 6

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.м.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) 644-63-11.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Типография ООО «Аллегро»

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

Подписано в печать 19.12.2022 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1386

© 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)

November–December

2022, volume 12

No. 6

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

Editor-in-chief

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

Deputy editor-in-chief

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

Members of editorial board

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

Luis Barbeito PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Pasteur de Montevideo, 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. Chereshevn 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) 644-63-11.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Produced at the Allegro Printing House

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

Passed for printing 19.12.2022. 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

Старкова Д.А., Сварваль А.В.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ГЛОБАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ *HELICOBACTER PYLORI* 1009

Токаревич Н.К., Блинова О.В.

ЛЕПТОСПИРОЗ ВО ВЬЕТНАМЕ 1019

Боева Е.В., Беляков Н.А., Симакина О.Е., Даниленко Д.М., Лиознов Д.А.

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ТЕЧЕНИЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ФОНЕ ПАНДЕМИИ COVID-19. СООБЩЕНИЕ 2. РЕАЛИЗАЦИЯ ИНТЕРФЕРЕНЦИИ МЕЖДУ SARS-CoV-2 И ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ 1029

Оригинальные статьи

Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д.

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА НКТ-КЛЕТОК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСХОДА РАСПРОСТРАНЕННОГО ГНОЙНОГО ПЕРИТОНИТА 1040

Инвияева Е.В., Вторушина В.В., Драпкина Ю.С., Кречетова Л.В., Долгушина Н.В., Хайдуков С.В.

КЛЕТОЧНЫЙ И ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ВЕКТОРНОЙ ВАКЦИНЫ ГАМ-КОВИД-ВАК 1051

Кайгородов Д.Г., Кайгородова А.Д.

НЕБЕЛКОВАЯ ФРАКЦИЯ СЕКРЕТОМА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБЛАДАЕТ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ЭФФЕКТОМ, В ТОМ ЧИСЛЕ ПРОТИВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ 1061

Козлова Я.И., Фролова Е.В., Кудрявцев И.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Аак О.В., Тараскина А.Е., Соболев А.В., Васильева Н.В., Климко Н.Н.

ВЛИЯНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ *ASPERGILLUS FUMIGATUS* НА РЕГУЛЯЦИЮ ИММУННОГО ОТВЕТА БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ 1069

Егорова С.А., Чуонг К.Н., Кафтырева Л.А., Кожухова Е.А., Макарова М.А., Куонг К.Х., Ву Х.Н., Хуонг Т.Э., Лан Т.К.Ч., Чам К.В., Лонг Т.Н., Диеп Т.Н.Н., Ту Л.К.Б., Тху Л.К.Н.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ШТАММОВ *SALMONELLA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ И ИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ В ЮЖНЫХ ПРОВИНЦИЯХ ВЬЕТНАМА 1081

Леденева М.Л., Ткаченко Г.А., Захарова И.Б.

НОВЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* 1091

Карташов М.Ю., Кривошеина Е.И., Свиринов К.А., Тупота Н.Л., Терновой В.А., Локтев В.Б.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА КЛЕЩЕЙ, НАПАДАЮЩИХ НА ЛЮДЕЙ В НОВОСИБИРСКЕ И ЕГО ПРИГОРОДАХ 1103

Хасанова А.А., Костинов М.П., Соловьева И.Л., Никитина Т.Н., Хромова Е.А.

ДИНАМИКА КЛИНИЧЕСКОЙ СИМПТОМАТИКИ И СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ 1113

Емероле К.Ч., Вознесенский С.Л., Самотолкина Е.С., Кожевникова Г.М., Климова П.В.

ОЦЕНКА ЯТРОГЕННЫХ ЭФФЕКТОВ ПОЛИПРАГМАЗИИ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ В ОТДЕЛЕНИИ ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ: ОДНОЦЕНТРОВОЕ РЕТРОСПЕКТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 1123

Николенко М.В., Барышникова Н.В., Малишевская О.И., Еноктаева О.В., Васева Е.М.

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ *CANDIDA* sp. В ТЕЧЕНИЕ СУТОК МОДИФИЦИРОВАННЫМ МАКРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ 1129

Кумбойоно К., Чомси И.Н., Виджаядас Д., Вихастути Т.А.

КОРРЕЛЯЦИЯ УРОВНЕЙ C_р-PLA2 И МОНОЦИТОВ У ЛЮДЕЙ С РИСКОМ АТЕРОСКЛЕРОЗА 1136

Шинь Ц.Т., Тханг Ч.Т., Тханг Т.Д., Лой К.Б., Ань Л.Ч.

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ТРЕХ 30-ДНЕВНЫХ КУРСОВ АЛЬБЕНДАЗОЛА
У БОЛЬНЫХ НЕЙРОЦИСТИЦЕРКОЗОМ 1143**

Палозян Г.О., Аветисян Ш.М., Абовян Р.А., Мелик-Андреасян Г.Г., Ванян А.В.

**ОЦЕНКА ВНЕДРЕНИЯ ПРОГРАММ ПРОФИЛАКТИКИ И ИНФЕКЦИОННОГО КОНТРОЛЯ
В СТАЦИОНАРАХ АРМЕНИИ НА ФОНЕ ПАНДЕМИИ COVID-19 1149**

Краткие сообщения

Монахова Е.В., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Селянская Н.А., Ежова М.И., Носков А.К.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА *VIBRIO CHOLERAE* nonO1/nonO139 —
ВОЗБУДИТЕЛЯ НОВОГО СЛУЧАЯ ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ В РОСТОВЕ-НА-ДОНУ 1156**

Коньшев И.В., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю., Бывалов А.А.

**ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ OmpF И OmpC ПОРИНОВ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*,
ОЦЕНЕННАЯ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ЛОВУШКИ 1163**

Холодов А.А., Захарова Ю.В., Отдушкина Л.Ю., Брюхачева Е.О., Пьянзова Т.В.

**ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ СООБЩЕСТВА ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* В КИШЕЧНОМ БИОТОПЕ
БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ 1169**

Супрун Е.Н., Супрун С.В., Власова М.А., Кудерова Н.И., Евсеева Г.П., Лебедько О.А.

**ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР И ВИРУСА ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА 6 ТИПА
НА ТЕЧЕНИЕ И КОНТРОЛЬ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ ПРИАМУРЬЯ 1175**

Кондратенко О.В., Сабурова М.С.

**ПОЛОСТЬ РТА КАК ЛОКУС ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ГЕТЕРОГЕННОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ
У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ 1181**

Мудров В.П.

ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ В ИММУНОДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА 1186

Воробьева О.В., Гималдинова Н.Е., Романова Л.П.

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА
ПРИ КОНКУРИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ: COVID-19 И САРКОИДОЗ 1191**

Правила для авторов 1197

Авторский указатель 1200

Предметный указатель 1200

CONTENTS

Reviews

Starkova D.A., Svarval A.V.

PHYLOGENETIC STRUCTURE OF THE GLOBAL POPULATION OF *HELICOBACTER PYLORI* 1009

Tokarevich N.K., Blinova O.V.

LEPTOSPIROSIS IN VIETNAM 1019

Boeva E.V., Belyakov N.A., Simakina O.E., Danilenko D.M., Lioznov D.A.

EPIDEMIOLOGY AND COURSE OF INFECTIOUS DISEASES DURING THE COVID-19 PANDEMIC. REPORT 2. INTERFERENCE ENGAGED BETWEEN SARS-CoV-2 AND ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS 1029

Original articles

Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavcev I.V., Belenjuk V.D.

DISSEMINATED PURULENT PERITONITIS OUTCOME AFFECTS NKT CELL PHENOTYPE 1040

Inviyaeva E.V., Vtorushina V.V., Drapkina J.S., Krechetova L.V., Dolgushina N.V., Khaidukov S.V.

POST-GAM-COVID-VAC COMBINED VECTOR VACCINE CELLULAR AND HUMORAL IMMUNE RESPONSE 1051

Kaigorodov D.G., Kaigorodova A.D.

THE NON-PROTEIN FRACTION OF EMBRYONIC STEM CELL SECRETOME EXERTS ANTIBACTERIAL EFFECTS AGAINST ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIAL STRAINS 1061

Kozlova Ya.I., Frolova E.V., Kudryavtsev I.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Aak O.V., Taraskina A.E., Sobolev A.V., Vasilyeva N.V., Klimko N.N.

THE INFLUENCE OF *ASPERGILLUS FUMIGATUS* MICROMYCETES ON IMMUNE RESPONSE REGULATION IN PATIENTS WITH ASTHMA 1069

Egorova S.A., Truong Q.N., Kaftyreva L.A., Kozhukhova E.A., Makarova M.A., Cuong Q.H., Vu H.N., Huong T.D., Lan T.Q.T., Tram K.V., Long T.N., Diep T.N.N., Tu L.K.B., Thu L.K.N.

SEROGROUPS AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *SALMONELLA* ISOLATED FROM PEOPLE AND FOOD ITEMS IN SOUTHERN PROVINCES OF VIETNAM 1081

Ledenyova M.L., Tkachenko G.A., Zakharova I.B.

NEW GENETIC MARKERS FOR *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* STRAINS TYPING 1091

Kartashov M.Yu., Krivosheina E.I., Svirin K.A., Tupota N.L., Ternovoi V.A., Loktev V.B.

GENOTYPING OF TICK-BORNE PATHOGENS AND DETERMINATION OF HUMAN ATTACKING TICK SPECIES IN NOVOSIBIRSK AND ITS SUBURBS 1103

Khasanova A.A., Kostinov M.P., Soloveva I.L., Nikitina T.N., Khromova E.A.

DYNAMICS OF CLINICAL SYMPTOMS AND SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A IN COVID-19 CONVALESCENT PATIENTS 1113

Emerole K.C., Voznesenskiy S.L., Samotolkina E.S., Kozhevnikova G.M., Klimkova P.V.

EVALUATING THE IATROGENIC EFFECTS OF POLYPHARMACY AND DRUG INTERACTIONS IN HIV-POSITIVE PATIENTS ADMITTED TO THE INTENSIVE CARE UNIT: A SINGLE-CENTER RETROSPECTIVE STUDY 1123

Nikolenko M.V., Baryshnikova N.V., Malishevskaya O.I., Enoktaeva O.V., Vaseva E.M.

A 24-HOUR *CANDIDA* sp. BIOFILM FORMATION DYNAMICALLY ASSESSED WITH MODIFIED MACROMETRIC METHOD 1129

Kumboyono K., Chomsy I.N., Vijayadas D., Wihastuti T.A.

A CORRELATION BETWEEN Lp-PLA2 AND MONOCYTE LEVELS IN ATHEROSCLEROSIS RISK SUBJECTS 1136

Sinh C.T., Thang T.T., Thang T.D., Loi C.B., Anh L.T.

THE EFFICACY AND SAFETY OF THREE 30-DAY COURSES OF ALBENDAZOLE IN PATIENTS WITH NEUROCYSTICERCOSIS	1143
---	-------------

Palozyan G.H., Avetisyan Sh.M., Abovyan R.A., Melik-Andreasyan G.G., Vanyan A.V.

ASSESSING IMPLEMENTATION OF PREVENTION AND INFECTION CONTROL PROGRAMS IN ARMENIAN HOSPITALS DURING THE COVID-19 PANDEMIC	1149
---	-------------

Short communications

Monakhova E.V., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Selyanskaya N.A., Ezhova M.I., Noskov A.K.

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF <i>VIBRIO CHOLERAE</i> nonO1/nonO139 STRAIN, THE CAUSATIVE AGENT OF A NEW CASE OF ACUTE INTESTINAL INFECTION IN ROSTOV-ON-DON	1156
---	-------------

Konyshov I.V., Novikova O.D., Portnyagina O.Yu., Byvalov A.A.

IMMUNOCHEMICAL ACTIVITY OF <i>YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS</i> OmpF AND OmpC PORINS EVALUATED BY OPTICAL TRAPPING	1163
---	-------------

Kholodov A.A., Zakharova Yu.V., Otdushkina L.Yu., Bryukhacheva E.O., Pyanzova T.V.

FEATURES OF THE <i>CANDIDA</i> GENUS COMMUNITY PATTERN IN THE INTESTINAL BIOTOPE OF PATIENTS WITH TUBERCULOSIS	1169
---	-------------

Suprun E.N., Suprun S.V., Vlasova M.A., Kuderova N.I., Evseeva G.P., Lebed'ko O.A.

AN IMPACT OF ACTIVATED EPSTEIN-BARR VIRUS AND HHV-6 ON THE COURSE AND CONTROL OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN OF THE AMUR REGION	1175
---	-------------

Kondratenko O.V., Saburova M.S.

THE ORAL CAVITY AS A SITE FOR DEVELOPING A HETEROGENEOUS BACTERIAL POPULATION IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS	1181
---	-------------

Mudrov V.P.

ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN THE IMMUNODIAGNOSTICS OF CHRONIC PERIODONTITIS	1186
--	-------------

Vorobeva O.V., Gimaldinova N.E., Romanova L.P.

PATHOMORPHOLOGICAL FEATURES OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME IN COMPETING LUNG DISEASES: COVID-19 AND SARCOIDOSIS	1191
--	-------------

Instructions to Authors	1197
--------------------------------------	-------------

Author index	1200
---------------------------	-------------

Subject index	1200
----------------------------	-------------

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ГЛОБАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ *HELICOBACTER PYLORI*

Д.А. Старкова, А.В. Сварваль

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

Резюме. По мнению большинства исследователей *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) является одной из самых древних бактерий в микробиоме человека. В ходе коэволюционных отношений человека и *H. pylori*, насчитывающих не менее 100 тыс. лет, высокая скорость адаптивных мутаций и рекомбинационных событий привели к необычайно высокому уровню геномного полиморфизма вида *H. pylori*. Несмотря на это, штаммы *H. pylori* были структурированы и разделены на различные популяции и субпопуляции в зависимости от их географического происхождения. На сегодняшний день определены семь современных популяций *H. pylori*: hpAfrica1, hpAfrica2, hpEastAsia, hpEurope, hpAsia2, hpNEAfrica и hspSahul, которые происходят по крайней мере от шести предковых популяций (ancestral European 1, ancestral European 2, ancestral EastAsia, ancestral Africa1, ancestral Africa2, ancestral Sahul). Многочисленные исследования позволили установить, что «прародиной» вида *H. pylori* является африканский континент. Глобальный филогенетический анализ последовательностей *H. pylori* выявил две суперлинии, одна из которых включала популяцию hpAfrica2, вторая — остальные популяции в единой монофилетической кладе. Это свидетельствует о том, что из всех популяций *H. pylori*, hpAfrica2 является самой древней, тогда как остальные продолжили свое эволюционное развитие по мере расселения человечества за пределы Африканского континента. Таким образом, популяционная диверсификация вида *H. pylori*, которая происходила параллельно с их хозяевами, позволила использовать генетические варианты *H. pylori* в качестве биологических маркеров, отражающих этнические и географические миграционные процессы в истории человека. Кроме того, быстрая и динамичная эволюция *H. pylori* информирует нас о продолжающихся до настоящего времени рекомбинационных событиях, что позволяет использовать *H. pylori* в качестве модели как для совместной эволюции патогенных бактерий и человека, так и для микроэволюции патогена в пределах одного индивидуума. В настоящем обзоре приводятся данные многочисленных исследований, касающихся эволюции и филогенетической структуры глобальной популяции *H. pylori*. Подробно описаны взаимоотношения между известными на сегодняшний день бактериальными популяциями и субпопуляциями, их географическое распределение, эволюционные траектории предковых популяций и пути появления новых субпопуляций патогена. Представлены новые данные о популяционной структуре российских штаммов *H. pylori*, а также штаммов, циркулирующих на территориях Северной, Центральной и Южной Америки. В ходе филогенетического анализа структуры популяции *H. pylori* представлена реконструкция тысячелетних миграционных и демографических процессов человека, а также сложного эволюционного пути бактериального вида *H. pylori*.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, структура популяции, hpAfrica2, hpAfrica1, hpNEAfrica, hpEurope, hpEastAsia, hpAsia2, hpSahul.

Адрес для переписки:

Старкова Дарья Андреевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.
Тел.: 8 (812) 233-21-49 (служебн.), 8 921 424-63-37 (моб.).
E-mail: dariastarkova13@gmail.com

Contacts:

Daria A. Starkova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 233-21-49 (office), +7 921 424-63-37 (mobile).
E-mail: dariastarkova13@gmail.com

Для цитирования:

Старкова Д.А., Сварваль А.В. Филогенетическая структура глобальной популяции *Helicobacter pylori* // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1009–1018. doi: 10.15789/2220-7619-РРО-1991

Citation:

Starkova D.A., Svarval A.V. Phylogenetic structure of the global population of *Helicobacter pylori* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1009–1018. doi: 10.15789/2220-7619-РРО-1991

PHYLOGENETIC STRUCTURE OF THE GLOBAL POPULATION OF *HELICOBACTER PYLORI*

Starkova D.A., Svarval A.V.

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

Abstract. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is widely considered to be one of the oldest bacteria in the human microbiome. During the co-evolutionary relationships between humans and *H. pylori* bacterium, spanning at least 100 000 years, a high rate of mutation and recombination events led to extremely high genomic polymorphism of the *H. pylori* species. Despite this, the large diversity of *H. pylori* genomes is very well structured, allowing to divide it into different populations associated with the geographic location of *H. pylori* strains. To date, seven modern *H. pylori* populations have been determined globally: hpAfrica1, hpAfrica2, hpEastAsia, hpEurope, hpAsia2, hpNEAfrica and hspSahul originated from at least six ancestral populations (ancestral European 1, ancestral European 2, ancestral EastAsia, ancestral Africa1, ancestral Africa2, ancestral Sahul). The global phylogenetic analysis showed that *H. pylori* is organized into two superlineages: one containing hpAfrica2 and the other containing all other populations in a single monophyletic clade. This indicates that, hpAfrica2 is the most ancient of all *H. pylori* populations, while the others continued evolutionary development along as mankind spread beyond the African continent. Thus, the *H. pylori* species populational diversification, which occurred in parallel with paired hosts, allowed us to use *H. pylori* genetic variants as biological markers, reflecting ethnogeographic migration processes in human history. Moreover, the rapid and dynamic evolution of *H. pylori* informs about ongoing recombination events enabling use *H. pylori* as a model both for the co-evolution of pathogenic bacteria and humans as well as for within-individual host pathogen microevolution. This review summarized developments from numerous studies on coevolution process and phylogenetic pattern of the global *H. pylori* population. The relationships between currently known bacterial populations and subpopulations, related geographical distribution, reconstruction of evolutionary pathway for ancestral and recent populations are detailed. New data on the *H. pylori* strain populational pattern in Russia, as well as strains circulating in the Northern, Central and South America, are presented. Phylogenetic analysis of the *H. pylori* population pattern permitted to reconstruct both prehistoric and recent human migrations, demographic processes as well as multilayered evolutionary pathways of *H. pylori* population.

Key words: *Helicobacter pylori*, population structure, hpAfrica2, hpAfrica1, hpNEAfrica, hpEurope, hpEastAsia, hpAsia2, hpSahul.

Введение

Helicobacter pylori (*H. pylori*) — граммотрицательная микроаэрофильная спиральная бактерия, которая колонизирует слизистую оболочку желудка более чем у 50% населения мира [7, 10]. Бактерия была открыта в 1983 г. австралийскими учеными Робинот Уорреном и Барри Маршаллом, которым за доказательства роли *H. pylori* в возникновении большинства гастродуоденальных заболеваний в 2005 г. была присуждена Нобелевская премия [19]. Открытие патогенных свойств *H. pylori* позволило не только выявить причину таких заболеваний как гастрит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, аденокарцинома и MALT-лимфома желудка, но и внедрить в медицинскую практику соответствующую антибактериальную терапию.

У подавляющего числа людей колонизация *H. pylori* носит бессимптомный характер, и лишь у 10–20% носителей развиваются патологические изменения ЖКТ [5]. Попав в организм хозяина в раннем детстве, *H. pylori* при отсутствии эффективного лечения сохраняется в течение всей жизни, активно передаваясь не только между членами одной семьи, но и в пределах сообществ, живущих на одной территории [32].

В ходе коэволюции человека и *H. pylori*, продолжающейся не менее 100 тыс. лет, высокая скорость накопления адаптивных мутаций и рекомбинаций привели к необычайно высокому уровню геномного полиморфизма вида *H. pylori* [22]. Конечным результатом явилось формирование

географически дифференцированных популяций и субпопуляций *H. pylori* [26].

Интересные данные об эволюции и генетической структуре популяции *H. pylori* были получены на основе мультилокусного типирования последовательностей (MLST, Multilocus Sequence Typing) семи генов домашнего хозяйства *atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureA* и *uphC*, которые представляют собой селективно нейтральные участки в геноме, а также двух генов, ассоциированных с вирулентностью, — *vacA* и *cagA*, которые в настоящее время не включены в анализ MLST [3, 13, 39]. Результаты секвенирования показали, что практически каждый штамм *H. pylori* ввиду высокой вариабельности генома имел уникальный профиль (тип), что для штаммов других видов является исключением, нежели правилом. Отсутствие клональной структуры привело к первоначальным предположениям о том, что популяция *H. pylori* является панмиктической [3]. Однако с увеличением размера выборки стало очевидно географическое распределение определенных типов MLST штаммов *H. pylori* и их корреляция с этнорегиональным происхождением [39].

На сегодняшний день определены семь современных популяций *H. pylori*: hpAfrica1, hpAfrica2, hpEastAsia, hpEurope, hpAsia2, hpNEAfrica и hspSahul, которые происходят по крайней мере от шести предковых популяций (ancestral European 1 (AE1), ancestral European 2 (AE2), ancestral EastAsia, ancestral Africa1, ancestral Africa2, ancestral Sahul) (рис. 1) [9, 15, 24]. Дальнейшее

пополнение данных о структуре популяции *H. pylori* отдельных регионов привело к делению каждой из семи популяций (с префиксом «hp») на субпопуляции (с префиксом «hsp»), которые генетически отличаются друг от друга, но менее дифференцированы, чем популяции [36]. Установление взаимоотношений между бактериальными популяциями и субпопуляциями позволило изучить как демографические, так и миграционные процессы человека, оказывающие значительное влияние на формирование филогенетического разнообразия глобальной популяции *H. pylori* [22].

Популяция hpAfrica2 штаммов *H. pylori*

По мнению большинства исследователей *H. pylori* является одной из самых древних бактерий в микробиоме человека. Время коэволюционного взаимодействия бактерии *H. pylori* с человеком по некоторым расчетам длится от 60 до 116 тыс. лет, что позволяет использовать генетические варианты *H. pylori* в качестве биологических маркеров, отражающих этнические и географические миграционные процессы в истории человека [25].

Африканский континент признан «прародиной» вида *H. pylori*, в составе которого идентифицированы три африканские популяции: hpAfrica1, hpAfrica2 и hpNEAfrica [28]. Глобальный филогенетический анализ последовательностей *H. pylori* выявил две суперлинии, одна из которых включала популяцию hpAfrica2, вторая — остальные популяции в единой монофилетической кладе. Это свидетельствует о том, что из всех популяций hpAfrica2 является самой филогенетически удаленной и древней, тогда как hpNEAfrica и hpAfrica1 продолжили свое эволюционное развитие, популяционно дифференцируясь по мере расселения человечества за пределы Африканского континента [25].

Примечательно, что штаммы популяции hpAfrica2 были выделены от различных этнических групп только на территориях Южной Африки (Южно-Африканская Республика [ЮАР], Намибия, юг Анголы) (рис. 2, вклейка, с. 1) [13, 22]. Подобная «изоляция» hpAfrica2 привела к предположениям о связи популяции с древними охотниками-собираателями племени Сан, которые, кроме того, являются преимущественными носителями гаплогруппы L0 митохондриальной ДНК — предковой для общей материнской линии человека. Это укрепило гипотезу о том, что представители народности Сан являются первыми хозяевами штаммов *H. pylori* hpAfrica2, которые явились основополагающими в эволюционном развитии остальных популяций [25].

Также было показано, что штаммы *H. pylori* hpAfrica2 являются ближайшими родственниками *H. acinonychis* — типичного обитателя организма крупных кошачьих [25]. Смена организма-хозяина, по-видимому, произошла в результате инфицирования от человека племени Сан одного из представителей кошачьих ~43–56 тыс. лет назад. Впоследствии, популяция hpAfrica2 разделилась на две субпопуляции: hspNorthSan — выделены от северных народностей в Намибии и Анголе, и hspSouthSan — выделены от народностей в Южной Африке. Полагают, что миграция популяции hpAfrica2 происходила преимущественно с севера на юг [21, 25].

Популяция hpAfrica1 штаммов *H. pylori*

Популяция hpAfrica1 штаммов *H. pylori* разделяется по всему континенту Африки, начиная от Алжира и Марокко на севере до ЮАР на юге. С помощью кластерного анализа было выявлено наличие трех региональных субпопуляций: hspWAfrica — доминирует на территориях Западной и Северной Африки (Сенегал, Гамбия,

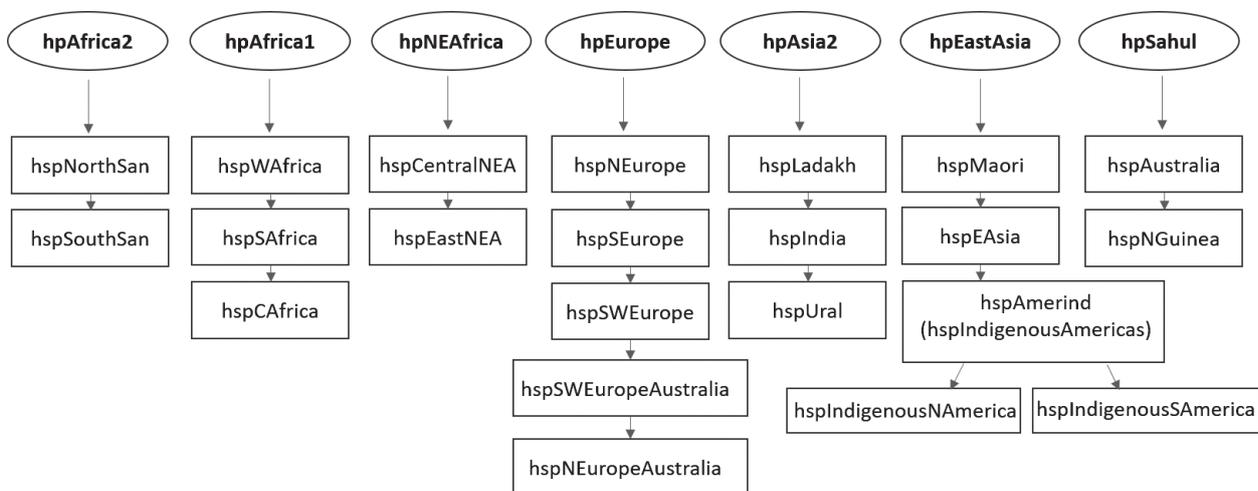


Рисунок 1. Структура глобальной популяции *H. pylori*

Figure 1. Structure of the global *H. pylori* population

Буркина-Фасо, Марокко, Алжир, Нигерия, Камерун), hspSAfrica — на юге Африки (Намибия, Ангола, ЮАР) и hspCAfrica — в Центральной Африке (Камерун, Намибия) (рис. 2, вклейка, с. 1) [9, 28, 30].

Полагают, что возникновение популяции hpAfric1 связано с миграцией из Нигерии/Камеруна народностей банту из языковой семьи Нигер-Конго. Территориальное расселение банту произошло предположительно 5 тыс. лет назад в период неолита в субэкваториальные районы Африки — климатически более подходящие для ведения сельского хозяйства [22, 25]. Маршрут миграции банту в южную часть Африки до сих пор является спорным: общепринятой является версия о миграции вдоль восточного побережья, однако обнаружение субпопуляции hspCAfrica в Камеруне и Анголе, но не в Южной Африке и Намибии (hspSAfrica), подтверждает существование маршрута, проходящего вдоль западного побережья Африки. По-видимому, препятствием к дальнейшему расселению народов банту с западной части на юг Африки послужила пустыня Намиб, в результате чего последовала вторая волна миграции к восточной части с последующим расселением на юге Африки [22, 28, 30]. Присутствие популяции hspSAfrica на Мадагаскаре предполагает миграцию народностей банту через Мозамбикский пролив во время или после их миграции вдоль восточного побережья Африки [16].

Популяция hpNEAfrica штаммов *H. pylori*

Другая волна миграции предков человека на север Африки привела к появлению еще одной генетической популяции *H. pylori*, получившей название hpNEAfrica. Эта популяция отделилась от hpAfric1 в промежутке 36–52 тыс. лет назад и вместе с hpAfric1 распространилась вдоль центральной части Сахеля и Северной Африки [15, 22, 25]. Частота обнаружения hpNEAfrica увеличивается к востоку до реки Нил и полуострову Сомали, территорию которого заселяли древние общества скотоводов, являвшиеся носителями нило-сахарского языка [22]. Наличие двух субпопуляций hspCentralNEA и hspEastNEA в популяции hpNEAfrica также послужило удобным маркером для выявления миграционных путей древних народностей. Присутствие hspCentralNEA в Камеруне, Анголе и Нигерии свидетельствует о волне миграции носителей нило-сахарского языка на запад во влажный период голоцена (6–9 тыс. лет назад) [28, 38]. Территориально популяционное разделение наблюдается в Судане по обе стороны от долины Нила, где две субпопуляции обнаруживаются с высокой частотой (рис. 2, вклейка, с. 1). Полагают, что популяция hpNEAfrica впоследствии распространилась на евразийскую территорию через Левант, положив начало предковой

популяции Ancestral Europe2 (AE2), которая в результате рекомбинации с популяцией Ancestral Europe1 (AE1) сформировали современную популяцию hpEurope [22, 38].

Популяция hpEurope штаммов *H. pylori*

Европейская популяция hpEurope является самой большой по численности и характеризуется наибольшим генетическим разнообразием по сравнению с остальными популяциями [38]. Глобальный анализ MLST штаммов *H. pylori* показал, что популяция hpEurope образовалась в результате гибридизации двух предковых популяций AE1 и AE2, ни одна из которых территориально не произошла из Европы [37]. Так, популяция AE2, принадлежащая к современной популяции hpNEAfrica, берет начало на территории Северо-Восточной Африки, а источником AE1, эволюционировавшей до современной hpAsia2, является Центральная Азия [17, 22, 37].

Большинство исследователей полагают, что ввиду слишком большого генетического разнообразия hpEurope, занос *H. pylori* в Европу был вызван не первой, а второй волной миграции человека с Африканского континента [25]. Подобное предположение основано на том, что предковая популяция AE2 (hpNEAfrica) отделилась от hpAfric1 в пределах 36–52 тыс. лет назад, а учитывая время, в течение которого происходили эволюционные и гибридизационные (с AE1) события, появление AE2 в европейской части евразийского континента несовместимо с первой миграцией человека из Африки, произошедшей около 60 тыс. лет назад. Однако до сих пор остается спорным вопрос об истинном территориальном происхождении гибрида AE1-AE2, а также точного времени интрогрессии предковых популяций [22, 25, 38].

Популяция hpEurope объединяет штаммы *H. pylori*, выделенные в странах Европы (рис. 2, вклейка, с. 1), однако наблюдается территориально неравномерное соотношение долей предковых линий AE1/AE2 [22]. Несмотря на то, что доли AE1/AE2 в популяции hpEurope распределены в соотношении ~50:50, было отмечено преобладание доли AE1 в Северной Европе (Финляндия, Эстония, Швеция, Великобритания, Ирландия, Нидерланды) и уменьшение доли AE1 в Южной Европе (Бельгия, Германия, Италия, Франция) с преобладанием AE2 [18, 37]. Данное открытие послужило основанием для предположения, что территориальным источником популяции hpEurope явились регионы «Плодородного полумесяца» (современные территории Кипра, Ливана, Израиля, Сирии, Ирака, юго-востока Турции, юго-запада Ирана и северо-запада Иордании) с последующим распространением популяции на европейской части в эпоху неолита [9, 18, 25, 37]. Другая версия основана на результатах MLST-анализа штамма *H. pylori*, выделенного из желудка Тирольского

ледяного человека (Эци), обнаруженного в 1991 г. в Эцтальских Альпах в Тироле. Возраст мумии, определенный радиоуглеродным методом, составлял примерно 5300 лет. Анализ генома древнего штамма *H. pylori* показал принадлежность не к *hpEurope*, а к современной популяции *hpAsia2* (AE1), которая распространена в Центральной и Южной Азии. Дальнейший анализ выявил, что в процентном соотношении на азиатскую популяцию AE1 приходится 93,5% генома древнего штамма, и лишь 6,5% — на африканскую популяцию *hpNEAfrica* (AE2). Таким образом, древний штамм *H. pylori* является первым доказательством того, что AE2 уже присутствовал в Центральной Европе в период медного века [17]. Низкий уровень содержания AE2 в геноме *H. pylori* предполагает, что большая часть предковой популяции AE2 (доля которой достаточно высока в современной популяции *hpEurope*) является результатом заноса AE2 в Европу в течение последних нескольких тысяч лет, что гораздо позднее установленных ранее временных интервалов. Однако ограниченность этого вывода связана с размером выборки (один штамм), что не позволяет получить статистически достоверные сведения о распространенности AE1 на территориях древней Европы или скорости интродукции AE2 [17, 18, 38].

До настоящего времени популяция *hpEurope* была разделена на две субпопуляции: *hspNEurope* (*hspNorthEurope*) и *hspSEurope* (*hspSouthEurope*). Однако в исследованиях Muñoz-Ramírez Z.Y. и соавт. (2021) была идентифицирована новая европейская субпопуляция *hspSWEurope*, имеющая генетическое родство с европейскими субпопуляциями Америки. Показано, что *hspSWEurope* циркулирует на территории Пиренейского полуострова и объединяет штаммы *H. pylori*, выделенные в Испании, Португалии, Франции [27]. Кроме того, Guevara A.A. и соавт. (2021) также выявил две новые субпопуляции *hpEurope* — *hspSWEuropeAustralia* и *hspNEuropeAustralia*, которые обнаружены только в Австралии (рис. 2, вклейка, с. 1) [10].

Таким образом, популяционная генетика *H. pylori* отражает не только доисторические миграции человека, но и относительно недавние миграционные события. Помимо стран Евразийского континента, популяция *hpEurope* обнаружена в Австралии, Африке, Северной и Южной Америке, на Филиппинах и островах южной части Тихого океана, что, очевидно, является результатом европейской колониальной экспансии, которая активно велась более четырех веков [9, 34, 38].

Популяция *hpEastAsia* штаммов *H. pylori*

HpEastAsia — типичная восточноазиатская популяция, которая отделилась от *hpAsia2* предположительно 30–50 тыс. лет назад и делится на три субпопуляции: *hspMaori*, *hspAmerind* (*hspIndigenousAmericas*) и *hspEAsia* [23, 24].

Субпопуляция *hspEAsia* является самой большой по численности и объединяет штаммы *H. pylori*, выделенные в странах Восточной Азии (Китай, Южная Корея, Сингапур, Малайзия, Тайвань, Камбоджа, Япония, Таиланд и Вьетнам) [33, 38]. Однородное распределение субпопуляции *hspEAsia* в этих странах, а также распространение крупной сино-тибетской языковой семьи на территориях Восточной, Юго-Восточной и Южной Азии, подтверждает миграцию китайского населения в течение последних 3 тыс. лет, в особенности в период экспансии династии Чжоу (1100–211 гг. до н.э.) [22].

HspAmerind (в настоящее время известна как *hspIndigenousAmericas*) — уникальная субпопуляция, которая обнаружена у коренного населения Северной и Южной Америки (индейцы, инуиты и др.). Недавно проведенные исследования выявили два подвида этнической субпопуляции *hspIndigenousAmericas*: *hspIndigenousNAmerica* (объединяла штаммы, выделенные в Канаде) и *hspIndigenousSAmerica* (штаммы из Южной Америки), ранее совместно обозначавшиеся как *hspAmerind* [23, 27].

По сравнению с остальными субпопуляциями, *hspIndigenousAmericas* характеризуется очень низким генетическим разнообразием. Это позволило предположить, что формирование *hspIndigenousAmericas* произошло в результате миграции небольшой группы людей из Восточной Азии через Берингов пролив около 8–11 тыс. лет назад [23]. Кроме того, штаммы *H. pylori* субпопуляции *hspIndigenousAmericas* были выделены на японских островах Хоккайдо и Окинава, что, возможно, является свидетельством разделения *hpEastAsia* и *hspIndigenousAmericas* в результате миграции людей через Тихий океан в еще более ранний период времени (до пересечения Берингова пролива) [27]. Таким образом, первые коренные американцы являлись носителями бактериальных штаммов *H. pylori* азиатского происхождения, которые изолированно эволюционировали в результате процессов рекомбинации и/или мутации [14]. Однако геномное разнообразие *H. pylori* в Америке резко изменилось после прибытия европейцев более 500 лет назад и начала трансатлантической работорговли, что привело к появлению новых популяций, сформировавшихся в результате смешения предковых геномов [23, 27].

Субпопуляция *hspMaori* впервые была обнаружена в Новой Зеландии у коренного населения Маори, позже — в Самоа, Новой Каледонии, островах Уоллис и Футуна, в Японии, а также на Тайване и Филиппинах (рис. 2, вклейка, с. 1) [9, 15, 24]. Глобальный филогенетический анализ штаммов *H. pylori* показал, что тайваньские штаммы являются предковыми по отношению к тихоокеанским и имеют значительно более высокий уровень генетического разнообра-

зия по сравнению с тихоокеанскими hspMaori. Полученные данные свидетельствуют об однонаправленной экспансии австронезийских мореплавателей на обширную территорию Океании — Филиппины, Меланезийские и Полинезийские острова Тихого океана, которые они активно заселяли. Прогнозируемое расхождение между тайваньским и тихоокеанским hspMaori произошло около 5 тыс. лет назад [24, 38].

Популяция hpAsia2 штаммов *H. pylori*

Из всех популяций *H. pylori*, появившихся за пределами Африки, hpAsia2 является наиболее интригующей. Эта популяция сформировалась у группы людей, которые либо не следовали южному прибрежному маршруту миграции, либо осели на ранних этапах миграции, а затем продолжили заселение вглубь Западной и Средней Азии [38]. Распространение hpAsia2 произошло на обширных территориях Евразии приблизительно 40 тыс. лет назад, скорее всего, до появления популяции hpEurope. В настоящее время на территории западной части Евразии популяция hpAsia2 в значительной степени замещена hpEurope, однако ее присутствие в Нидерландах, Финляндии и Эстонии подтверждает предположение, что предковая популяция AE1 изначально присутствовала на евразийских землях до появления AE2 с юга [22, 38].

Интересна склонность hpAsia2 к образованию рекомбинантных популяций при вторичном контакте с другими популяциями *H. pylori*. Действительно, все известные в мире рекомбинантные популяции *H. pylori* включают hpAsia2 в качестве одной из родительских популяций. Помимо рекомбинации hpAsia2 с популяцией hpNEAfrica, в результате чего сформировалась hpEurope, hpAsia2 также участвовала в интрогрессии с двумя другими популяциями — hpNorthAsia и hpEastAsia, в результате чего образовались две рекомбинантные субпопуляции hspSiberia1 и hspSiberia2. С другой стороны, увеличение количества рекомбинантных популяций могло быть вызвано повторными заносами hpAsia2 в географические области, содержащие другие популяции [23].

Популяция hpAsia2 делится на субпопуляции hspLadakh — обнаружена в изолированном гималайском регионе северной Индии — и hspIndia, которая доминирует в Индии, Бангладеш, Малайзии, Тайланде и на Филиппинах (рис. 2, вклейка, с. I) [8, 35]. Полагают, что субпопуляция hspIndia была дважды занесена в Юго-Восточную Азию: первый раз, скорее всего, с прибытием носителей языковой группы тайкадай на территорию нынешнего Таиланда (начало второго тысячелетия н.э.) и второй раз — с мигрантами из Индии в XIX в. [8, 22].

В результате недавно проведенных исследований Moodley Y. и соавт. (2021) была обнару-

жена третья субпопуляция hpAsia2 — hspUral, которая тесно связана с hspLadakh и hspIndia и выделяется от уральскоязычных этносов Западной Сибири — хантов и ненцев. Полагают, что заселение Сибири могло быть связано как с продолжающимся последним ледниковым максимумом (26,5–19 тыс. лет назад), так и с репопуляцией населения в голоценовом периоде. В дальнейших исследованиях субпопуляция hspUral может являться маркером распространения уральских языков за пределы Сибири в Северную Европу [23].

Популяция hpSahul штаммов *H. pylori*

Сахул — доисторический континент, который образовался ~98 млн лет назад и объединял нынешние Антарктиду, Австралию и Новую Гвинею. Примерно 40 млн лет назад от Сахула отделилась Антарктида, однако Австралия и Новая Гвинея оставались связанными до конца последнего ледникового максимума. Считается, что заселение Сахула произошло в результате миграции людей за пределы Африки по прибрежному маршруту, проходящему через южную Индию, Андаманский архипелаг и Суэндаланд [22]. Таким образом, в результате тесного генетического родства коренных народов Австралии и Новой Гвинеи, штаммы *H. pylori* ~31–37 тыс. лет назад сформировали единую популяцию — hpSahul, занимающую промежуточное положение между африканскими и азиатскими популяциями [24]. Однако археологические свидетельства эпохи плейстоцена показывают другую дату человеческой колонизации Сахула — ~42–48 тыс. лет назад [6, 24].

Глобальный филогенетический анализ показал, что занос *H. pylori* на территорию Сахула произошел единожды. Впоследствии в результате повышения уровня моря и обособления Австралийского континента от Новой Гвинеи популяция hpSahul разделилась на две дискретные субпопуляции: hspAustralia и hspNGuinea (рис. 2, вклейка, с. I). Используя уникальную коллекцию штаммов, полученных от аборигенов Австралии и Новой Гвинеи, было показано практически полное отсутствие дрейфа генов между субпопуляциями hspAustralia и hspNGuinea [22, 38].

Структура популяции *H. pylori* в России

Известно, что обширная территория Сибири, простирающаяся от Уральских гор до Тихого океана, является малонаселенной, однако при этом здесь исторически проживает большое число коренных народов (~36) из различных языковых семей. Несмотря на сложные климатические условия, современные люди впервые появились на территории Сибири около 45 тыс.

лет назад и, по мнению ряда исследователей, развили адаптивные механизмы, обеспечивающие их постоянное присутствие в данном регионе в течение последнего ледникового максимума (26,5–19 тыс. лет назад). Кроме того, геномные исследования древнего человека свидетельствуют о том, что Сибирь была воротами для миграции людей в Северную Америку (через Берингов пролив/перешеек), а также в Западную Евразию [22, 23].

Глобальный анализ сибирских штаммов *H. pylori*, проведенный Moodley Y. и соавт. (2021), позволил выявить пять новых субпопуляций, которые являются эндемичными для регионов Сибири: hspUral, hspAltai, hspSiberia1, hspSiberia2 и hspKet (рис. 2, вклейка, с. 1). Происхождение сибирских субпопуляций является результатом рекомбинации нескольких предковых популяций. Так, субпопуляция hspSiberia1 возникла в результате смешения hpAsia2 и hpNorthAsia, hspSiberia2 — в результате смешения hpAsia2 и hpEastAsia, а hspKet — в результате смешения hpNorthAsia и hspSiberia2. Упомянутая ранее субпопуляция hspUral, выделенная от уральско-язычных хантов и ненцев Западной Сибири, составляет третью субпопуляцию hpAsia2 и может служить микробным маркером для изучения миграционного пути носителей уральского языка за пределы Сибири в Северную Европу [23].

К наиболее интересному открытию следует отнести выявление на всей территории Сибири субпопуляции hspIndigenousAmericas, которая, как предполагалось ранее, распространена лишь среди коренных народов Северной и Южной Америки. Присутствие hspIndigenousAmericas по обе стороны Берингова пролива может являться следствием долгосрочного взаимодействия между жителями побережья обоих континентов. Полученные данные также подтверждают гипотезу о единой миграции северных евразийцев через Берингов пролив в период плейстоцена и последующей колонизацией Нового Света, а также о еще более ранней миграции современного человека на территорию северной Евразии [23, 38].

Субпопуляция hspIndigenousAmericas наиболее тесно связана с новой сибирской субпопуляцией hspAltai, которая территориально ограничена Центральной Сибирью и выявляется в основном у тюркских и монгольских народов, в меньшей степени — у тунгусских народностей. Ввиду высокого распространения субпопуляций hspIndigenousAmericas и hspAltai на территории Сибири, а также высокой степени их филогенетического родства, Moodley Y. и соавт. объединили их в новую популяцию hpNorthAsia, на которую приходится 44% сибирских штаммов *H. pylori*. Предположительно, hspAltai возник в результате генетического дрейфа от общего с hpNorthAsia предка и дифференцировался от hpNorthAsia ~199–2328 лет назад [23]. Нынешнее распростра-

нение hspAltai среди тюрко- и монголоязычных сибиряков предполагает распространение данной субпопуляции в результате недавних миграций тюркских (VI–XVI вв.) и монгольских (XIII в.) народов [41].

Однако большинство сибирских генотипов (52%) не кластеризовались ни с одной из вышеупомянутых популяций и формировали три обособленные субпопуляции: hspSiberia1, hspSiberia2 и hspKet. Полагают, что все три популяции возникли во время голоцена и, скорее всего, в результате процессов геномного смешения, а не дивергенции.

Наиболее географически распространенной субпопуляцией являлась hspSiberia1, которая объединяла штаммы *H. pylori* от всех исследуемых коренных народов Сибири. Второй по численности являлась субпопуляция hspSiberia2, которая выявлена у некоторых коренных народов (ненцы, ханты, тувинцы, нанайцы, коряки, чукчи). Третья субпопуляция hspKet была обнаружена лишь у этнических кетов в Центральной Сибири. Эволюционное происхождение субпопуляции hspKet связано, по-видимому, с рекомбинацией между hpNorthAsia и hspSiberia2 [23, 31].

Нами уже была описана склонность популяции hpAsia2 к формированию рекомбинантных популяций при вторичном контакте с другими популяциями. Не явились исключением и две сибирские субпопуляции hspSiberia1 и hspSiberia2, которые сформировались в результате рекомбинационных событий между родительскими популяциями hpAsia2-hpNorthAsia и hpAsia2-hpEastAsia соответственно. Однако ввиду близкого родства субпопуляций hspSiberia1 и hspSiberia2 нельзя исключить альтернативные эволюционные сценарии их возникновения. Сравнение полногеномных последовательностей сибирских штаммов *H. pylori*, возможно, позволит пролить свет на возникновение субпопуляций hspSiberia1 и hspSiberia2 [23].

К сожалению, в российской литературе имеется ограниченное количество публикаций, посвященных филогенетическому анализу российских штаммов *H. pylori*. Так, Сорокин В.М. и соавт. (2021) показали, что штаммы *H. pylori*, выделенные на территории Европейской части России, принадлежат к популяции hpEurope с равномерным распределением долей предковых популяций AE1 и AE2 [2]. Полученные данные согласуются с исследованиями Moodley Y. и соавт. (2016). В исследованиях Борисовой Т.В. и соавт. (2018), европейское происхождение было выявлено у 89,3% штаммов *H. pylori*, циркулирующих в Якутии [1]. Отчасти это может быть связано с приходом переселенцев из европейской части России со второй половины XVI до конца XVII в. и значительным сокращением коренного населения Сибири аналогичным тому, что произошло с народами Мезоамерики в процессе европейской колонизации [20].

Структура популяции *H. pylori* в Северной и Южной Америке

В результате крупномасштабного филогенетического анализа штаммов *H. pylori*, циркулирующих на территориях Северной, Центральной и Южной Америки, были идентифицированы три субпопуляции европейского происхождения, имеющие наибольшее генетическое родство с hspSWEurope: hspSWEuropeColombia (ранее обозначалась как hspEuropeColombia; обнаружена в Колумбии), hspSWEuropeHonduras (Гондурас, Никарагуа, Гватемала, Сальвадор) и hspSWEuropeMexico (Мексика). Помимо указанных, также были выявлены три субпопуляции, предком которых является африканская популяция hpAfrica1: hspAfrica1NAmerica (США, Канада, Бразилия, Колумбия), hspAfrica1MiscAmerica (Мексика, Колумбия) и hspAfrica1SAfrica (ранее обозначалась как hspAfrica1Nicaragua; циркулирует преимущественно в Никарагуа и Гондурасе) (рис. 2, вклейка, с. I) [27].

В результате недавно проведенных исследований Guevara A.A. и соавт. (2021), получены новые данные о структуре латиноамериканской популяции *H. pylori*. Авторами была идентифицирована еще одна колумбийская субпопуляция hspColombia. Данная популяция была разделена на три субпопуляции, соответствующие региону происхождения: hspColombia_Nariño (выявлена в департаменте Колумбии Нариньо), hspColombia_Andes (горный регион Анд) и hspColombia_Cundinamarca (департамент Колумбии Кундинамарка). Большинство колумбийских штаммов (~81%) принадлежали к hspSWEuropeColombia и hspColombia [10].

Анализ генетической структуры штаммов *H. pylori*, выделенных в различных регионах Перу, позволил идентифицировать новую субпопуляцию — hspEuropePeru, которая содержала менее 15% предковой субпопуляции hspAmerind и локально развивалась у представителей современных метисов [12].

Региональное структурирование американских популяций *H. pylori* европейского и африканского происхождения отражает закономерности миграционных путей колонизационной истории человека, берущей начало со времен Колумба. Так, формирование латиноамериканских субпопуляций от европейской hspSWEurope согласуется с миграцией людей из Испании

и Португалии [29]. Наличие субпопуляций, происходящих от африканской hspAfrica1, является следствием колониальной миграции людей в результате работорговли XVI–XIX вв.

Интересно, что «доколумбовая» субпопуляция hspIndigenousAmericas (hspAmerind) не оказала существенного влияния на формирование геномов других американских субпопуляций. Это может свидетельствовать о том, что после долгосрочной независимой эволюции «этнические популяции» *H. pylori* плохо адаптируются к демографическим изменениям, мало приспособлены к конкуренции с новыми популяциями и не подвержены сопутствующим геномным изменениям [26, 29, 38].

В США, помимо доминирующей субпопуляции hspAfrica1NAmerica, небольшие группы штаммов *H. pylori* принадлежали к субпопуляциям hspSEurope, hspSWEurope, hspNEurope и hspAfrica1MiscAmerica. Однако среди всех стран Северной и Южной Америки наибольшее количество субпопуляций *H. pylori* наблюдается в Мексике: hspSWEuropeMexico, hspAfrica1NAmerica, hspSWEuropeHonduras, hspAfrica1MiscAmerica, hspIndigenousSAmerica и hspSWEurope. Подобное популяционное разнообразие, по-видимому, отражает историческую роль Мексики в качестве миграционных ворот в Америку для европейских государств, а также межконтинентального средоточия популяционного разнообразия человека [4, 27].

Заключение

Таким образом, высокая частота внутри- и межштаммовых рекомбинаций по-прежнему является основным двигателем эволюции *H. pylori*. Выявление различных изменений в геномной структуре *H. pylori* позволяет установить не только эволюционные траектории предковых популяций, но и пути появления новых субпопуляций патогена. Кроме того, понимание природы коэволюции *H. pylori* с организмом хозяина необходимо для выявления адаптивных и эволюционных процессов взаимодействия, способствующих развитию инфекции. Изучение глобальной структуры популяции *H. pylori* открывает уникальные возможности для реконструкции тысячелетних миграционных путей человека, демографических процессов и эволюционного пути бактериального вида.

Список литературы/References

1. Борисова Т.В., Готовцев Н.Н., Барашков Н.А., Пак М.В., Алексеева М.П., Иннокентьева Н.Н., Морозов И.В., Бондарь А.А., Лоскутова К.С., Соловьев А.В., Пшенникова В.Г., Рафаилов А.М., Леханова С.Н., Федорова С.А. Филогенетический анализ штаммов *Helicobacter pylori*, циркулирующих в Якутии, по данным трех генов домашнего хозяйства *atpA*, *mutY*, *ppa* // Вестник Северо-Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова. 2018. № 5. С. 15–24. [Borisova T.V., Gotovtsev N.N., Barashkov N.A., Pak M.V., Alekseyeva M.P., Innokent'yeva N.N., Morozov I.V., Bondar' A.A., Loskutova K.S., Solov'yev A.V., Pshennikova V.G., Rafailov A.M., Lekhanova S.N., Fedorova S.A. Phylogenetic analysis of *Helicobacter pylori* strains circulating in Yakutia by three housekeeping genes *atpA*, *mutY*, *ppa*. *Vestnik Severo-Vostochnogo federal'nogo universiteta imeni M.K. Ammosova = Vestnik of North-Eastern Federal University*, 2018, no. 5, pp. 15–24. (In Russ.)] doi: 10.25587/SVFU.2018.67.18653

2. Сорокин В.М., Сварваль А.В., Водопьянов А.С., Писанов Р.В. Географическое разнообразие штаммов *Helicobacter pylori*, циркулирующих в европейской части РФ // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 701–706. [Sorokin V.M., Svarval A.V., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V. Geographical diversity of *Helicobacter pylori* strains circulating in the European Part of the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 701–706. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-GDO-1590
3. Achtman M., Azuma T., Berg D.E., Ito Y., Morelli G., Pan Z.J., Suerbaum S., Thompson S.A., van der Ende A., van Doorn L.J. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol. Microbiol.*, 1999, vol. 32, no. 3, pp. 459–470. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01382.x
4. Adhikari K., Chacón-Duque J.C., Mendoza-Revilla J., Fuentes-Guajardo M., Ruiz-Linares A. The genetic diversity of the Americas. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2017, no. 18, pp. 277–296. doi: 10.1146/annurev-genom-083115-022331
5. Alexander S.M., Retnakumar R.J., Chouhan D., Devi T.N.B., Dharmaseelan S., Devadas K., Thapa N., Tamang J.P., Lamtha S.C., Chattopadhyay S. *Helicobacter pylori* in human stomach: the inconsistencies in clinical outcomes and the probable causes. *Front. Microbiol.*, 2021, no. 12: e713955. doi: 10.3389/fmicb.2021.713955
6. Allen J., O'Connell J. Both half right: updating the evidence for dating first human arrivals in Sahul. *Aust. Archaeol.*, 2014, vol. 78, no. 1, pp. 86–108. doi: 10.1080/03122417.2014.11682025
7. Baj J., Forma A., Sitarz M., Portincasa P., Garruti G., Krasowska D., Maciejewski R. *Helicobacter pylori* virulence factors — mechanisms of bacterial pathogenicity in the gastric microenvironment. *Cells*, 2020, vol. 10, no. 1: 27. doi: 10.3390/cells10010027
8. Breurec S., Guillard B., Hem S., Brisse S., Dieye F.B., Huerre M., Oung C., Raymond J., Tan T.S., Thiberge J.M., Vong S., Monchy D., Linz B. Evolutionary history of *Helicobacter pylori* sequences reflect past human migrations in Southeast Asia. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 7: e22058. doi: 10.1371/journal.pone.0022058
9. Falush D., Wirth T., Linz B., Pritchard J.K., Stephens M., Kidd M., Blaser M.J., Graham D.Y., Vacher S., Perez-Perez G.I., Yamaoka Y., Mégraud F., Otto K., Reichard U., Katzowitsch E., Wang X., Achtman M., Suerbaum S. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, 2003, vol. 299, no. 5612, pp. 1582–1585. doi: 10.1126/science.1080857
10. Guevara A.A., Torres R.C., Castro-Valencia F.L., Suárez J.J., Criollo-Rayó A., Bravo M.M., Carmona L.C., Echeverry de Polanco M.M., Bohórquez M.E., Torres J. Selective pressure on membrane proteins drives the evolution of *Helicobacter pylori* Colombian subpopulations. *bioRxiv*, 2021: 12.14.472690. doi: 10.1101/2021.12.14.472690
11. Guevara T.A.A. A systematic review of genetic coevolution of homo sapiens and *helicobacter pylori*: implications for development of gastric cancer. *Revista Colombiana de Gastroenterol.*, 2017, no. 31, pp. 376–390. doi: 10.22516/25007440.113
12. Gutiérrez-Escobar A.J., Velapatiño B., Borda V., Rabkin C.S., Tarazona-Santos E., Cabrera L., Cok J., Hooper C.C., Jahuir-Arias H., Herrera P., Noureen M., Wang D., Romero-Gallo J., Tran B., Peek R.M. Jr., Berg D.E., Gilman R.H., Camargo M.C. Identification of new *Helicobacter pylori* subpopulations in native americans and mestizos from Peru. *Front. Microbiol.*, 2020, no. 11: 601839. doi: 10.3389/fmicb.2020.601839
13. Hanafiah A., Lopes B.S. Genetic diversity and virulence characteristics of *Helicobacter pylori* isolates in different human ethnic groups. *Infect. Genet. Evol.*, 2020, vol. 78: 104135. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104135
14. Kersulyte D., Kalia A., Gilman R.H., Mendez M., Herrera P., Cabrera L., Velapatiño B., Balqui J., Paredes Puente de la Vega F., Rodríguez Ulloa C.A., Cok J., Hooper C.C., Dailide G., Tamma S., Berg D.E. *Helicobacter pylori* from Peruvian amerindians: traces of human migrations in strains from remote Amazon, and genome sequence of an Amerind strain. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 11: e15076. doi: 10.1371/journal.pone.0015076
15. Linz B., Balloux F., Moodley Y., Manica A., Liu H., Roumagnac P., Falush D., Stamer C., Prugnolle F., van der Merwe S.W., Yamaoka Y., Graham D.Y., Perez-Trallero E., Wadstrom T., Suerbaum S., Achtman M. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*, 2007, vol. 445, no. 7130, pp. 915–918. doi: 10.1038/nature05562
16. Linz B., Vololonantenainab C.R., Seck A., Carod J.F., Dia D., Garin B., Ramanampamonjy R.M., Thiberge J.M., Raymond J., Breurec S. Population genetic structure and isolation by distance of *Helicobacter pylori* in Senegal and Madagascar. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 1: e87355. doi: 10.1371/journal.pone.0087355
17. Maixner F., Krause-Kyora B., Turaev D., Herbig A., Hoopmann M.R., Hallows J.L., Kusebauch U., Vigl E.E., Malferttheiner P., Mégraud F., O'Sullivan N., Cipollini G., Coia V., Samadelli M., Engstrand L., Linz B., Moritz R.L., Grimm R., Krause J., Nebel A., Moodley Y., Rattei T., Zink A. The 5300-year-old *Helicobacter pylori* genome of the Iceman. *Science*, 2016, vol. 351, no. 6269, pp. 162–165. doi: 10.1126/science.aad2545
18. Maixner F., Thorell K., Granehäll L., Linz B., Moodley Y., Rattei T., Engstrand L., Zink A. *Helicobacter pylori* in ancient human remains. *World J. Gastroenterol.*, 2019, vol. 25, no. 42, pp. 6289–6298. doi: 10.3748/wjg.v25.i42.6289
19. Marshall B.J., Warren J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1984, vol. 1, no. 8390, pp. 1311–1315. doi: 10.1016/s0140-6736(84)91816-6
20. McNeill W.H. *Plagues and peoples*. New York: Anchor Books, 1976. 365 p.
21. Mégraud F., Lehours P., Vale F.F. The history of *Helicobacter pylori*: from phylogeography to paleomicrobiology. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2016, vol. 22, no. 11, pp. 922–927. doi: 10.1016/j.cmi.2016.07.013
22. Moodley Y. *Helicobacter pylori*: genetics, recombination, population structure, and human migrations. *Helicobacter pylori Research. J.*, 2016, pp. 3–27. doi: 10.1007/978-4-431-55936-8_1
23. Moodley Y., Brunelli A., Ghirotto S., Klyubin A., Maady A.S., Tyne W., Muñoz-Ramírez Z.Y., Zhou Z., Manica A., Linz B., Achtman M. *Helicobacter pylori*'s historical journey through Siberia and the Americas. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2021, vol. 118, no. 25: e2015523118. doi: 10.1073/pnas.2015523118
24. Moodley Y., Linz B. *Helicobacter pylori* sequences reflect past human migrations. *Genome Dyn.*, 2009, no. 6, pp. 62–74. doi: 10.1159/000235763
25. Moodley Y., Linz B., Bond R.P., Nieuwoudt M., Soodyall H., Schlebusch C.M., Bernhöft S., Hale J., Suerbaum S., Mugisha L., van der Merwe S.W., Achtman M. Age of the association between *Helicobacter pylori* and man. *PLoS Pathog.*, 2012, vol. 8, no. 5: e1002693. doi: 10.1371/journal.ppat.1002693
26. Muñoz-Ramírez Z.Y., Mendez-Tenorio A., Kato I., Bravo M.M., Rizzato C., Thorell K., Torres R., Aviles-Jimenez F., Camorlinga M., Canzian F., Torres J. Whole genome sequence and phylogenetic analysis show *helicobacter pylori* strains from latin america have followed a unique evolution pathway. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, no. 7: 50. doi: 10.3389/fcimb.2017.00050

27. Muñoz-Ramirez Z.Y., Pascoe B., Mendez-Tenorio A., Mourkas E., Sandoval-Motta S., Perez-Perez G., Morgan D.R., Dominguez R.L., Ortiz-Princz D., Cavazza M.E., Rocha G., Queiroz D.M.M., Catalano M., Palma G.Z., Goldman C.G., Venegas A., Alarcon T., Oleastro M., Vale F.F., Goodman K.J., Torres R.C., Berthenet E., Hitchings M.D., Blaser M.J., Sheppard S.K., Thorell K., Torres J. A 500-year tale of co-evolution, adaptation, and virulence: *Helicobacter pylori* in the Americas. *ISME J.*, 2021, vol. 15, no. 1, pp. 78–92. doi: 10.1038/s41396-020-00758-0
28. Nell S., Eibach D., Montano V., Maady A., Nkwescheu A., Siri J., Elamin W.F., Falush D., Linz B., Achtman M., Moodley Y., Suerbaum S. Recent acquisition of *Helicobacter pylori* by Baka pygmies. *PLoS Genet.*, 2013, vol. 9, no. 9: e1003775. doi: 10.1371/journal.pgen.1003775
29. Oleastro M., Rocha R., Vale F.F. Population genetic structure of *Helicobacter pylori* strains from portuguese-speaking countries. *Helicobacter*, 2017, vol. 22, no. 4. doi: 10.1111/hel.12382
30. Pakendorf B., Bostoen K., de Filippo C. Molecular perspectives on the Bantu expansion: a synthesis. *Lang Dyn. Chang.*, 2011, no. 1, pp. 50–88. doi:10.1163/221058211X570349
31. Pugach I., Matveev R., Spitsyn V., Makarov S., Novgorodov I., Osakovsky V., Stoneking M., Pakendorf B. The complex admixture history and recent southern origins of siberian populations. *Mol. Biol. Evol.*, 2016, vol. 33, no. 7, pp. 1777–1195. doi: 10.1093/molbev/msw055
32. Reshetnyak V.I., Burnistrov A.I., Maev I.V. *Helicobacter pylori*: commensals, symbiont or pathogens? *World J. Gastroenterol.*, 2021, vol. 27, no. 7, pp. 545–560. doi: 10.3748/wjg.v27.i7.545
33. Subsomwong P., Miftahussurur M., Vilaichone R.K., Ratanachu-Ek T., Suzuki R., Akada J., Uchida T., Mahachai V., Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* virulence genes of minor ethnic groups in North Thailand. *Gut Pathog.*, 2017, vol. 9, no. 56. doi: 10.1186/s13099-017-0205-x
34. Suerbaum S., Achtman M. *Helicobacter pylori*: recombination, population structure and human migrations. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2004, no. 294, pp. 133–139. doi: 10.1016/j.ijmm.2004.06.014
35. Tay C.Y., Mitchell H., Dong Q., Goh K.L., Dawes I.W., Lan R. Population structure of *Helicobacter pylori* among ethnic groups in Malaysia: recent acquisition of the bacterium by the Malay population. *BMC Microbiol.*, 2009, vol. 9, no. 126, pp. 1–13. doi: 10.1186/1471-2180-9-126
36. Thorell K., Yahara K., Berthenet E., Lawson D.J., Mikhail J., Kato I., Mendez A., Rizzato C., Bravo M.M., Suzuki R., Yamaoka Y., Torres J., Sheppard S.K., Falush D. Rapid evolution of distinct *Helicobacter pylori* subpopulations in the Americas. *PLoS Genet.*, 2017, vol. 13, no. 2: e1006546. doi: 10.1371/journal.pgen.1006546
37. Vale F.F., Vadivelu J., Oleastro M., Breurec S., Engstrand L., Perets T.T., Mégraud F., Lehours P. Dormant phages of *Helicobacter pylori* reveal distinct populations in Europe. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5: 14333. doi: 10.1038/srep14333
38. Waskito L.A., Yamaoka Y. The story of *Helicobacter pylori*: depicting human migrations from the phylogeography. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2019, no. 1149, pp. 1–16. doi: 10.1007/5584_2019_356
39. Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* typing as a tool for tracking human migration. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009, vol. 15, no. 9, pp. 829–834. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02967.x
40. Yunusbayev B., Metspalu M., Metspalu E., Valeev A., Litvinov S., Valiev R., Akhmetova V., Balanovska E., Balanovsky O., Turdikulova S., Dalimova D., Nymadawa P., Bahmanimehr A., Sahakyan H., Tambets K., Fedorova S., Barashkov N., Khidiyatova I., Mihailov E., Khusainova R., Damba L., Derenko M., Malyarchuk B., Osipova L., Voevoda M., Yepiskoposyan L., Kivisild T., Khusnutdinova E., Vilems R. The genetic legacy of the expansion of Turkic-speaking nomads across Eurasia. *PLoS Genet.*, 2015, vol. 11, no. 4: e1005068. doi: 10.1371/journal.pgen.1005068

Авторы:

Старкова Д.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории идентификации патогенов, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Сварваль А.В., к.м.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией идентификации патогенов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Starkova D.A., PhD (Biology), Senior Researcher of the Pathogens Identification Laboratory, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Svarval A.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Head of the Pathogens Identification Laboratory, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.06.2022
 Отправлена на доработку 20.08.2022
 Принята к печати 02.11.2022

Received 24.06.2022
 Revision received 20.08.2022
 Accepted 02.11.2022

LEPTOSPIROSIS IN VIETNAM

N.K. Tokarevich, O.V. Blinova

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

Abstract. Leptospirosis poses a serious public health problem in many countries because about 1 million people suffer annually from this severe, often fatal, infection. At present, its importance has been increasing due to development of integration processes, globalization and intensification of economic activities, inevitable anthropogenic transformation of landscapes as well as rise in number of people with occupational risk of pathogen exposure. The burden of human leptospirosis is expected to rise with demographic shifts and climate change that result in heavy rainfall and flooding. Regarding leptospirosis, Southeast Asia, including Vietnam, is among the most vulnerable global regions. The objective of the review was to analyze available published data on the spread of leptospirosis in Vietnam. More than 100 research articles were analyzed allowing to state that in Vietnam synanthropic rodents (rats), agricultural (buffaloes, cattle, pigs) and domestic animals (cats, dogs) are the main sources of leptospirosis infection in humans. It is essential that rats (cats and dogs also) in Vietnam are used for food. Among all farm animals, pigs are of maximal importance as a source of infection in humans. In Vietnam, *Leptospira* prevalence in pigs varies widely, up to 73%. It depends significantly on the location, farm size, age and gender of animals, etc. A large variety of *Leptospira* serovars have been identified in pigs in Vietnam: Tarassovi, Bratislava, Australis, Javanica, Autumnalis, Grippotyphosa, and some others. Official Vietnam reporting of leptospirosis cases based on clinical data does not reflect the real-life incidence rate in humans. However, the available seroprevalence studies reveal that, on average, about 10% of the Vietnamese population are infected with *Leptospira*. Work in agriculture is the dominant risk factor for acquiring this infection. The highest *Leptospira* seroprevalence rates were detected in farmers, 63.2%. Serovar diversity is typical for pathogenic *Leptospira* circulating in Vietnam. In humans, the most frequent are antibodies to Hebdomadis, Wolffii and Icterohaemorrhagiae, but the frequency varied markedly across the country depending on the site, possibly with relation to the environment, as well as with economic activity of the local population. In Vietnam, geographic, climatic and social differences between northern, central and southern regions contribute to the specificity of local leptospirosis epidemiology. This emphasizes the advisability of developing special measures for leptospirosis prevention taking into account regional peculiarities.

Key words: leptospirosis, *Leptospira*, *Leptospira* serovars, morbidity, rats, buffalo, cattle, seroprevalence, antibodies.

ЛЕПТОСПИРОЗ ВО ВЬЕТНАМЕ

Токаревич Н.К., Блинова О.В.

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

Резюме. Лептоспироз представляет серьезную проблему для здравоохранения многих стран, так как в мире ежегодно около 1 млн людей болеют этой тяжелой инфекцией, часто оканчивающейся летальным исходом. В настоящее время значение этой проблемы возрастает, что связано с развитием интеграционных процессов, обусловленных глобализацией экономики, интенсификацией хозяйственной деятельности, приводящей к антропогенной трансформации ландшафтов и расширению контингента лиц, входящих в угрожаемые профессии, а также глобальными климатическими изменениями. Юго-Восточная Азия, включая Вьетнам, относится к числу самых неблагоприятных в отношении лептоспироза регионов мира. Целью работы является

Адрес для переписки:

Токаревич Николай Константинович
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-21-36.
E-mail: zoonoses@mail.ru

Contacts:

Nikolay K. Tokarevich
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-21-36.
E-mail: zoonoses@mail.ru

Для цитирования:

Токаревич Н.К., Блинова О.В. Лептоспироз во Вьетнаме // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1019–1028. doi: 10.15789/2220-7619-LIV-1988

Citation:

Tokarevich N.K., Blinova O.V. Leptospirosis in Vietnam // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1019–1028. doi: 10.15789/2220-7619-LIV-1988

современный анализ литературных данных о распространении лептоспирозной инфекции во Вьетнаме. В ходе данной работы было проанализировано более 100 научных статей. Это позволило констатировать, что основными источниками лептоспирозной инфекции во Вьетнаме являются синантропные грызуны (крысы), сельскохозяйственные (буйволы, крупный рогатый скот, свиньи) и домашние (кошки и собаки) животные. Существенной особенностью заражения жителей Вьетнама является употребление ими в пищу крыс, кошек и собак. Из сельскохозяйственных животных в качестве источника инфекции наибольшее значение имеют свиньи. Показатели инфицированности этих животных лептоспирами колеблются в широких пределах, достигая 73%. Значение этих показателей существенно различаются в зависимости от территории обитания животных, от размера фермы, возраста, пола свиней, от количества осадков и ряда других факторов. У свиней во Вьетнаме было выявлено большое разнообразие сероваров лептоспир среди которых преобладали Tarassovi, Bratislava, Australis, Javanica, Autumnalis, Grippotyphosa и другие. Официальная отчетность о заболеваниях лептоспирозом, основанная на клинических данных, не отражает реальное количество больных во Вьетнаме. В среднем около 10% жителей Вьетнама инфицировано лептоспирами. Работа в сельском хозяйстве является доминирующим фактором риска заражения. Наиболее высокие показатели серопревалентности к лептоспирам были выявлены у фермеров — 63,2%. Для Вьетнама характерно большое разнообразие сероваров циркулирующих лептоспир. Наиболее часто у людей выявляются антитела к лептоспирам сероваров Hebdomadis, Wolffii и Icterohaemorrhagiae, но частота их встречаемости существенно различалась между собой в разных регионах, что, можно полагать, связано с ландшафтно-климатическим своеобразием территории, а также обусловлено хозяйственной деятельностью людей. Географические, климатические и социальные различия северной, центральной и южной части Вьетнама в значительной степени определяют эпидемиологические особенности лептоспироза. Это усиливает целесообразность разработки конкретных мер профилактики этой инфекции для каждой территории с учетом их специфики.

Ключевые слова: лептоспироз, лептоспиры, серовары лептоспир, заболеваемость, крысы, буйволы, крупный рогатый скот, серопревалентность, антитела.

Introduction

Leptospirosis is a globally widespread disease, largely due to the wide range of reservoir hosts of pathogenic *Leptospira* and animals susceptible to them [9]. Thus, according to the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG), the number of severe leptospirosis cases in humans exceeds 500 000 per year, though real incidence may be even much higher due to insufficient attention to this infection and difficulties of its diagnostics [78]. Some other researchers emphasize that leptospirosis is among the main global zoonoses, and it accounts for the number of deaths that exceeds mortality due to other causes of hemorrhagic fever. The annual number of leptospirosis cases exceeds one million, and 58 900 of fatal outcomes are recorded worldwide annually [26].

The highest leptospirosis incidence rate in humans is reported in subtropical and tropical climatic zones (e.g., in Seychelles, Malaysia, New Caledonia, Suriname), with 20.0–100.0 per 100 thousand population [4, 31, 46, 86]. Vietnam is a country in Southeast Asia that is one of the most vulnerable regions in the world with regard to leptospirosis. The region ranks second in the world (next to Oceania), both for leptospirosis morbidity and mortality [26]. Moreover, it was possibly in Southeast Asia, under conditions of high humidity and swampiness, long before the appearance of humans, that certain species of *Leptospira* adapted to parasitizing the bodies of animals, primarily rodents [5]. Currently, leptospirosis poses a significant public health problem in many countries, including Russia [9]. However, Southeast

Asia, Vietnam particularly, provides the most favorable conditions for the survival of *Leptospira* as the pathogen prefers a warm and humid climate. The essential social significance of leptospirosis lies in the occupational risk of infection to which people are exposed in connection with the work they perform [15]. The Government of Vietnam has recognized the priority of five zoonotic diseases, including leptospirosis, and established a framework to investigate and respond to these diseases through the One Health program [63]. The socio-economic importance of leptospirosis is increasing due to a number of drivers. The most important of them are as follows.

1. Integration is proceeding and developing through: globalization of the economy; international economic cooperation; and trade, including export/import of animals (agricultural, domestic, wild), food, and feed [60]. All this favors the introduction of pathogenic *Leptospira* into virgin territories [2, 3]. Development of international tourism entails growth in the number of patients infected with *Leptospira* abroad [14, 45, 57]. Several cases of leptospirosis (including fatal) have been reported in Russian tourists that had acquired the infection in Vietnam [6, 7, 10].

2. Intensification of economic activity is leading to anthropogenic transformation of landscapes and a growth in the number of the threatened workers. More than 50% of the Vietnamese population is employed in the agricultural sector [24]. In the previous century, it was noted that the cultivation of rice provides favorable conditions both for survival of *Leptospira* in the environment and for the habitat of the pathogen's potential carriers [1]. Rice is the main agricultural crop

in Vietnam; its production and export increase steadily. According to the Ministry of Agriculture and Rural Development of the Socialist Republic of Vietnam, the country's rice output in 2021 reached over 43.86 million tons, up 1.1 million tons compared to 2020 [85]. In 2020, Vietnam exported \$2.74 billion worth of rice to many countries, making it the third largest rice exporter in the world [66]. Leptospirosis in Vietnam (in the Mekong Delta, first of all) may be considered an environmentally linked disease.

Obviously, the spread of leptospirosis is underestimated in Southeast Asia and, possibly, in other rice-growing countries [81]. Animal husbandry is an important sector of the Vietnamese national economy, and livestock is potentially an important reservoir for pathogenic *Leptospira* [36]. Significant changes have recently taken place in this sector in Vietnam. These resulted both in a notable increase in the number of farm animals (pigs alone about 29 million heads) and in an improvement in technologies of meat processing and trade in supermarkets. However, infection with some *Leptospira* serovars may reduce one live pig born per litter, equivalent to 8% loss of production [18].

3. Global climate change may soon transform Vietnam into one of the countries most affected by weather [31, 53]. This means more extensive flooding of agricultural land during the rainy season and increased salinization during the dry season as a result of sea level rise and higher river flooding. In the Mekong Delta, about 590 000 hectares of rice land would be lost due to flooding and salinization; that is about 13 percent of rice growing fields in the region [87]. Leptospirosis is commonly considered a flood-related infection [47]. Some findings support the hypothesis that soils may be the original habitat of the genus *Leptospira* and a possible environmental reservoir, or at least a temporary carrier, of pathogenic strains [23, 76, 77]. Rains wash the surface of the soil, transferring particles including *Leptospira* into suspension [70, 75]. Thus, *Leptospira* penetrate freshwater bodies, where it survives even under unfavorable conditions [74], potentially infecting people on rice plantations. On the other hand, during the dry season, salinity will grow due both to sea level rise and higher river flooding.

The objective of this review was to analyze the literature data on the spread of leptospirosis infection in Vietnam.

Materials

Articles were sought from Web of Science and international databases: Medline (through PubMed), Science Direct, and Google Scholar. We used a combination of the following search terms: [Leptospirosis AND Vietnam]. The total number of references exceeded 100, but we excluded those non-essential and added a number of important references (mostly in Russian) not available in those databases.

Geography

Vietnam is situated at the southeastern tip of the Indochinese Peninsula. On the east side, Vietnam contacts the South China Sea. The geographical position of Vietnam has a pronounced, elongated meridional character. The nation stretches along the 105th meridian in a narrow strip. This specific feature of Vietnamese geography, together with alternation of highlands and lowlands, results in a significant variety of climatic conditions.

Vietnam has both a tropical climate zone and a temperate climate zone, with all of the country experiencing the effects of the annual monsoon. Rainy seasons correspond to monsoon circulations, which bring heavy rainfall in the north and south from May to October, and in the central regions from September to January. In the northern regions, average temperatures range from 22–27.5°C in summer to 15–20°C in winter. The southern areas have a narrower range of 28–29°C in summer to 26–27°C in winter. Vietnam's climate is also impacted by the El Niño Southern Oscillation (ENSO), which influences monsoonal circulation, and drives complex shifts in rainfall and temperature patterns which vary spatially at a sub-national level. Due to such different geographical and climatic features, which to a certain extent determine socio-economic characteristics, Northern, Central and Southern Vietnam are usually considered separately. This has prompted researchers to analyze the impact of abiotic, biotic, and social factors on the spread of leptospirosis infections in those different regions of Vietnam [55].

Leptospira reservoirs

Small synanthropic mammals, rats first of all, are the most important reservoirs of pathogenic *Leptospira*. The principal feature of their behavior is living close to humans, in residential premises or commercial facilities (livestock farms, enterprises for the processing of animal raw materials, warehouses, etc.). Moreover, rats penetrate natural foci, easily contact wild animals, and can exchange *Leptospira*. Infection in rodents proceeds mostly in chronic, non-fatal forms, but causes very long, often lifelong, excretion of the pathogen in the animal urine. In Vietnam, the risk of human infection with *Leptospira* from those animals is especially high, since rats, including those imported from abroad, are traditionally used for food [41]. In 1962 in the south of Vietnam (Saigon, currently Ho Chi Minh City), *Leptospira* were isolated from *Rattus norvegicus*. Those *Leptospira* were assigned to *L. bataviae* by the cross agglutination lysis and cross absorption tests, although they were not antigenically identical to the reference strain or its variant subserotype [40]. Those synanthropic mammals serve as an important source of human infection in the cities of Vietnam, as *Leptospira* prevalence in rats is high.

Thus, in January 2011 in northern Vietnam (urban areas of Hanoi and Hai Phong), 22% of 100 studied rats were found to have antibodies to *L. interrogans* [44]. In a later study, another group of researchers in Vietnam not only confirmed such high infection prevalence in rats, but also isolated *Leptospira* from 3 rats [43] and from 144 rats (135 *R. norvegicus*, 8 *R. rattus*, 1 *R. argentiventer*) captured in Vietnam. In total, 17 *L. interrogans* were isolated, of which 16 isolates belonged to the Bataviae serogroup [42]. More recent studies conducted in southwestern Vietnam used not only serological, but also molecular genetic methods (using RT-PCR for the lipL32 gene, confirmed by 16S rRNA, as well as by the microscopic agglutination test-MAT). The results also bear witness to a high prevalence of *Leptospira* in those synanthropic animals. Antibodies to *Leptospira* were detected in 18.3% of rats, namely in *Rattus norvegicus* (33.0%), *Bandicota indica* (26.5%), *Rattus tanezumi* (24.6%), *Rattus exulans* (14.3%), and *Rattus argentiventer* (7.1%). The most common serovars, in descending order, were: Javanica (4.6% of rats), Louisiana (4.2%), Copenhageni (4.2%), Cynopterie (3.7%), Pomona (2.9%), and Icterohaemorrhagiae (2.5%). A total of 16 rats (5.8%) tested positive by RT-PCR. There was considerable agreement between the MAT and PCR, although significantly more rats were positive by MAT. *Leptospira* seroprevalence in rats caught during the rainy season was higher than in those caught in the dry season [52].

The results of a study performed by a Russian-Vietnamese group of researchers in seven northern provinces of Vietnam (Dien Bien, Laitiau, Lao Cai, Ha Giang, Lang Son, Cao Bang, Quang Ninh) confirmed the high infection of small wild mammals with *Leptospira*. PCR-based study of lung and kidney suspensions of 158 animals revealed 16S rRNA of pathogenic *Leptospira* in 22 (13.9%) samples [8]. Another Russian-Vietnamese group investigated by real-time PCR 133 rodents (of 25 species) trapped in 2010, 2013, 2014, and 2018 in three provinces of northern Vietnam (Ha Giang, Cao Bang, Lao Cai); 24 rodents (18%) were positive for *Leptospira*. Those were: *Callosciurus erythraeus*, *Bandicota savilei*, *Berylmys bowersi*, *Niviventer fulvescens*, *Rattus nitidus*, *Rattus cf. rattus*, and *Rattus tanezumi*. The Tanezumi rat (*Rattus tanezumi*), also known as the Asian rat or Asian house rat, dominated: 11 of 44 animals (33.1%) were infected [12]. When comparing the results of a study on sera of 156 rats from different provinces of Vietnam, it was found that *Leptospira* seroprevalence in the southern province (Can Tho) was higher than in the central (Ha Tinh) or in the northern (Tai Binh): 24.6%, 10.0%, and 11.4%, respectively. The average value was 16.0% [55]. Therefore, *Leptospira* prevalence in rats was close to those obtained in earlier studies conducted in the Mekong Delta region [52, 58, 17]. Their findings were at the level of those for other countries of Southeast Asia, such as Thailand, Lao PDR and Cambodia; the mean prevalence was about 7.1% [25].

However, it should be mentioned that in Southeast Asia, Vietnam included, the prevalence of *Leptospira* in rats was found to be rather low as compared to other southern countries. The highest *Leptospira* prevalence in rats (> 70%) was reported in Brazil [62, 29, 26, 27], Mexico [59], Egypt [69], and some other countries [17]. The study conducted in three provinces of Vietnam [55] revealed that the seroprevalence in animals other than rats was much higher: 44.2% in buffalo (n = 52), 32.9% in dogs (n = 219), 24.9% in cattle (n = 233), while only 12.2% in cats (n = 164), and 10.2% in pigs (n = 381). In total, it means that *Leptospira* seroprevalence in animals in the northern province (Tai Binh) was higher than in the central (Ha Tinh) or the southern (Can Tho): 25.9%, 13.3%, and 19.8%, respectively. However, consideration of seroprevalence in individual animal species clarifies significantly our knowledge about the infection of animals with *Leptospira* in different regions of Vietnam.

It should be noted that the sera of buffaloes, in the samples of which antibodies to *Leptospira* were found more often than in other animal species, were not examined in Can Tho, as buffalo are not common in this province. Naturally, the lack of data on those animals in the southern Vietnam had an impact on the total seroprevalence in animals of the region. Moreover, it was found that in Can Tho *Leptospira* seroprevalence in cattle (n = 69) was higher than in Tai Binh (n = 80) or Hatin (n = 84): 30.4%, 22.5%, and 22.6%, respectively. *Leptospira* seroprevalence in dogs, cats and pigs in Tai Binh exceeded that in both other provinces. Thus, in dogs it was 46.7% in Tai Binh (n = 60), 15.2% in Hatin (n = 79), and 40.0% in Can Tho (n = 32). The same figures for cats were 25.0% in Tai Binh (n = 60), 4.8% in Hatin (n = 42), and 4.8% in Can Tho (n = 62). *Leptospira* seroprevalence in pigs was 20.5% in Tai Binh (n = 122), 3.3% in Hatin (n = 121), and 7.2% in Can Tho (n = 138).

Hebdomadis, Louisiana, and Javanica were the most common serovars detected in buffalo, while in pigs it was Castelloni, and in rats Louisiana. In cattle, 15 different serovars were detected, Hebdomadis and Canicola being the most frequent. Thirteen serovars were identified in dogs, but Hardjobovis was the most frequently detected. Six serovars were detected in cats; Louisiana, Hebdomadis, and Castellonis dominated.

Using a low dilution threshold for sera containing antibodies to *Leptospira* (1:100), 17 *Leptospira* serovars were detected in the studied animals, of which Hebdomadis (2.3%), Molasses (1.6%), Castelloni (1.5%), and Javanica (1.4%) were the most frequent. Panama, Tarassovi, Australis, and Autumnalis were found in all three provinces, while Bratislava was found only in Can Tho. It should be pointed out that all 17 *Leptospira* serovars were present in Can Tho, while only 12 and 8 serovars were found in Taibin and Hatin, respectively [55].

In Vietnam, infection of humans with *Leptospira* occurs not only through direct contacts with dogs and cats (or the use of water or food contaminated by them), but also through consumption of their meat, as those animals are used for food [11, 13]. Pigs are of great importance in Vietnam because of their contribution to human nutrition, their role in agricultural production systems, and their economic function. Vietnam's pig herd is the largest in Southeast Asia [51]. In 2020 it exceeded 27 million head, and about 7 million Vietnamese people were involved in pigs raising in 2016 [34]. Therefore, pigs are considered the main source of leptospirosis in humans. In addition, leptospirosis in pigs leads to large economic losses due to abortion and infertility of animals [49].

In Vietnam, *Leptospira* seroprevalence in pigs ranged up to 73% among sows ($n = 424$) in the Mekong Delta, where leptospirosis is endemic [18]. High *Leptospira* prevalence in pigs was also confirmed by pathogen detection in pig kidneys. Thus, in the Mekong Delta (south Vietnam), *Leptospira* were detected by immunofluorescence in 22 of 32 pigs (69%), and *Leptospira* serovar Bratislava was isolated from the kidney of one pig [19]. A serological survey was conducted among sows in the Mekong Delta in southern Vietnam in 1999 to investigate variations in *Leptospiral* seroprevalence over a one-year period. In this region, leptospirosis is endemic, and a high *Leptospiral* seroprevalence has been shown in the pig population [20].

However, a rather low prevalence (8.17%) was detected in a seroprevalence study of pigs ($n = 1959$) randomly selected in five provinces (Son La, Hanoi, Nghe An, Dak Lak, An Giang) [49]. The low *Leptospira* prevalence, according to those authors, was due to a number of reasons, as follows. Serum was sampled during dry or early wet seasons, when seroprevalence is likely to be lower than in the rainy season [71]. Most of other studies were conducted in the Mekong Delta of southern Vietnam, relatively close to riverine areas, which provide more exposure to contaminated water and hence higher levels of *Leptospira* prevalence. Sera were sampled at slaughterhouses, from rather young animals (aged 6–9 months), while older pigs are more likely to be infected with *Leptospira* [18]. Animals chosen for slaughter usually look healthy and probably are less infected with *Leptospira*.

However, some other researchers do not share the conclusion about favorable conditions for infection of pigs with *Leptospira* in the Mekong Delta. Thus, in a study of 2000 sera from 10 provinces, the average *Leptospira* seroprevalence was 21.05%, while that of the samples from three provinces lying in the Mekong Delta was much lower: 10.0% in Soc Trang and 11.5% in Dong Thap. The highest detected seroprevalence values were 37.5% in Quang Ngai (Central region), 32.5% in Binh Duong (South), and 30.5% in Bac Giang (North) [50]. There is probably

some impact from the amount of precipitation, as has already been proven for Brazil [68], India [71], and Korea [39]. In addition to the aforementioned drivers of *Leptospira* prevalence in pigs, it is likely that animal gender should be taken into account as well [49]. The size of the farms involved into the study is also important, including possible herd movements [48].

Some downtrend in *Leptospira* prevalence in pigs may be due to co-infection and reduction in the number of those animals due to the outbreak of African swine fever in 2019, which led to culling and death of approximately 5.9 million pigs (about 22%) [22, 88]. In 2021, ASF outbreaks were ongoing in 48 out of 63 provinces in Vietnam, resulting in the death and culling of nearly 280 000 pigs with a total weight of about 11 678 metric tons, about 3.6-fold higher than the culled numbers in the same period of 2020 [21].

A wide variety of *Leptospira* serovars were identified in pigs: Tarassovi, Bratislava, Australis, Javanica, Autumnalis, Grippotyphosa, etc. [18, 19, 20]. In particular, Pyogenes and Panama serovars were isolated [50] that already had been detected in cattle in some other countries [33, 56, 61]. It should be noted that the Pyogenes serovar was detected in Quang Ngai, the province known for its large herd of cattle. One may assume the cattle to be a source of *Leptospira* in local pigs. In addition, it has been suggested that since *Leptospira* of Bratislava and Tarasovi serovars are common in wild boars [37, 80], those animals may also contribute to pathogen transmission to farm pigs [48].

Leptospirosis in humans

Leptospirosis was first identified in Vietnam in 1930 [28, 82]. At the end of the twentieth century, prevalence in humans was rather high: 18.8% of the inhabitants in the Mekong Delta aged 15–60 years had antibodies to *Leptospira* [81]. Moreover, it should be highlighted that even now leptospirosis is underdiagnosed in many countries, Vietnam included. Due to significant polymorphism of its clinical course and shortcomings in laboratory diagnostics, leptospirosis is often misdiagnosed as some other febrile illnesses such as dengue, scrub typhus, or chikungunya [30, 32, 38, 65]. In Vietnam, nationwide reporting on infectious diseases is carried out by the General Department of Preventive Medicine of the Ministry of Health. Their statistics are built on the basis of clinical information, resulting in significant underdiagnosis of leptospirosis. Therefore, in 2014–2017, the Vietnamese Ministry of Health reported roughly less than 20 cases nationwide per year. In 2018, both morbidity and mortality due to leptospirosis were reported to be zero [35, 84].

However, some scientific publications on *Leptospira* seroprevalence in humans contradict the official statistics on leptospirosis in Vietnam [46, 83]. In 2019 (November–December), a serological examination of 600 practically healthy residents of three

provinces (representing North, Central North and South Vietnam) revealed antibodies to *Leptospira* in 9.5% of them. Antibodies to *Leptospira* serovars Hebdomadis (14.0%), Pomona (14.0%), Saxkoebing (12.3%), and Panama (8.8%) were most frequently detected. *Leptospira* seroprevalence varied significantly: from 5.5% in Can Tho City, to 9.0% in Thai Binh, and 14% in Ha Tinh province. The highest rate of *Leptospira* seroprevalence, 63.2%, was found in farmers [79]. The seropositivity in Vietnam seemed rather low compared to other Southeast Asian countries.

For instance, in Malaysia the seroprevalence of *Leptospiral* antibodies in high-risk groups was up to 28.6% (in planters) and 33.6% (wet market workers) [64, 67]. However, the difference may be related to the choice of humans under study. The difference in prevalence might be due to the fact that in Malaysia the occupationally high-risk group was examined, while in Vietnam they “randomly” selected healthy residents aged above four, and the highest rate of seroprevalence to *Leptospira* (63.2%) was revealed in farmers [79].

In our opinion, the detection of antibodies to *Leptospira* in almost 10% of healthy humans in three different provinces clearly indicates that the official data on the registration of leptospirosis do not reflect the real spread of this infection in Vietnam. This is confirmed by the results of a study of sera sampled from 3815 patients with suspected leptospirosis. The patients were examined in 11 public hospitals from three provinces (Thai Binh, Ha Tinh, Can Tho), representing three different geographical and climatic zones of Vietnam. The result proved that the conclusions of the authors about the unsatisfactory diagnosis of leptospirosis were valid not only for individual territories, but for the whole of Vietnam [54]. Surveillance revealed that in 68 (1.8%) and 248 (6.5%) cases, a leptospirosis diagnosis was confirmed, or regarded as likely, according to the microscopic agglutination test (MAT) or enzyme immunoassay (ELISA-IgM), respectively. In addition, more than 30% of patient serum samples contained IgM antibodies (according to ELISA data) to *Leptospira*. The number of laboratory-confirmed leptospirosis cases was highest in Thai Binh (2.3%), while somewhat lower in Ha Tinh (2.0%) and Can Tho (1.0%). Laboratory values considered “probable for leptospirosis” were even higher: 8.5% in Ha Tinh, 7.1% in Can Tho, and 7.0% in Thai Binh.

In three provinces, 20 different serovars (with a titer threshold of 1:100 to 1:400) were detected using MAT, indicating diversification of *Leptospira* serovars circulating in Vietnam. Of those 20 serovars, 17 were found in Hatin, 16 in Taibin, and 12 in Can Tho. In general, the serovars Wolffii (14.2%), Hebdomadis (13.8%), and Icterohaemorrhagiae (12.6%) prevailed, but their incidence varied significantly in the three provinces. Castellonis (12.3%),

Djasiman (12.3%), and Wolffii (12.3%) dominated in Taibin. Icterohaemorrhagiae (19%) and Wolffii (15%) dominated in Khatin. Hebdomadis (23.6%) and Wolffii (15.3%) prevailed in Can Tho.

According to aggregate findings in those three provinces, leptospirosis was more common in women (57.9%) than in men (42.1%). It is not typical for most countries and may be explained by the fact that 85.9% of women in Vietnam are employed in agriculture. Of the probable and confirmed cases of leptospirosis, approximately two-thirds were farmers, and most of them were involved in raising agriculture or domestic animals. Working in agriculture is probably the main risk factor for contracting leptospirosis in Vietnam. Thus, 53.5% and 83.2% of patients with probable or confirmed leptospirosis were farmers in Taibin and Hatin, respectively.

About two thirds of patients with leptospirosis were people of working age, 24 to 60 years [54]. Although adults are more frequently infected with *Leptospira* due to their professional activities, children also acquire this pathogen. Thus, a serological study of children in the south of Vietnam revealed an average *Leptospira* prevalence of 12.8% [72]. It ranged from 11% in 7 years-old up to 25% in 12-year-old children [73]. It is possible that walking barefoot in the mud, swimming in polluted water, etc., may cause *Leptospira* infection in children [54]. There is evidence that virulent *Leptospira* survive in the environment for several months [16].

Conclusion

The main sources of leptospirosis infection in Vietnam are synanthropic rodents (rats), agricultural animals (buffaloes, cattle, pigs) and domestic animals (cats, dogs). Among all farm animals, pigs are the most important source of *Leptospira* in Vietnam, as about 7 million of the country's population work in the pig breeding sector. The seroprevalence of leptospirosis in pigs is up to 73% in some locations (Mekong Delta), though it varies significantly depending on the territory, farm size, animal age and gender, amount of precipitation, etc. A specific and essential feature of the infection in Vietnam is human consumption of cats, dogs, and rats.

Official reporting of leptospirosis cases based on clinical data does not reflect the actual number of patients in Vietnam. On average, about 10% of the population was found to be infected with *Leptospira*. Work in the agriculture sector is the dominant risk factor for acquiring the infection. The highest *Leptospira* seroprevalence was detected in farmers. Women are infected more often than men. About two thirds of patients with leptospirosis were people of working age (24 to 60 years), but antibodies to *Leptospira* were also detected in 12.8% of children. A very wide variety of pathogenic *Leptospira* serovars was detected in Vietnam. The list of pathogenic

Leptospira varies significantly depending on the region. This is due to variation of environment, landscape and climatic features of the territory, as well as the economic profile of the province. Geographic, climatic and social differences in the northern, cen-

tral and southern regions of Vietnam largely determine the epidemiological features of leptospirosis within the territory. This argues for the advisability of developing measures to prevent this infection in each region, taking into account their specifics.

References

1. Лептоспирозы людей и животных / Под ред. проф. В.В. Ананьина. М.: Медицина, 1971. 352 с. [Leptospirosis in humans and animals. Ed. Prof. V.V. Ananyin. Moscow: Medicine, 1971. 352 p. (In Russ.)]
2. Ананьина Ю.В. Природно-очаговые бактериальные зоонозы: современные тенденции эпидемического проявления // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2002. № 6. С. 86–90. [Ananyina Ju.V. Bacterial zoonoses with natural focality: current trends in epidemic manifestation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2002, no. 6, pp. 86–90. (In Russ.)]
3. Ананьина Ю.В. Лептоспирозы людей и животных: тенденции распространения и проблемы профилактики // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010. № 2 (51). С. 13–16. [Ananyina Ju.V. Human and animal leptospirosis: prevalence trends and preventive measures. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2010, no. 2 (51), pp. 13–16. (In Russ.)]
4. Бренева Н.В., Балахонов С.В. Вопросы эндемичности и энзоотичности лептоспирозов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2019. № 5. С. 118–125. [Breneva N.V., Balakhonov S.V. Endemicity and enzooticity aspects of leptospirosis. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunologii = Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii*, 2019, no. 5, pp. 118–125. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2019-5-118-125
5. Жданов В.М. Эволюция заразных болезней человека. М.: Медицина, 1964. 375 с. [Zhdanov V.M. The evolution of human infectious diseases. Moscow: Medicine, 1964. 375 p. (In Russ.)]
6. Киселева Е.Ю., Бренева Н.В., Лемешевская М.В., Бурданова Т.М. Завозной случай лептоспироза с летальным исходом из Вьетнама в Иркутскую область // Инфекционные болезни. 2014. Т. 12, Вып. 3. С. 95–99. [Kiseleva E.Yu., Breneva N.V., Lemeshevskaya M.V., Burdanova T.M. An imported case of leptospirosis with a lethal outcome from Vietnam to the Irkutsk region. *Infektsionnye bolezni = Infectious Disease*, 2014, vol. 12, no. 3, pp. 95–99. (In Russ.)]
7. Никулина М.А., Гранитов В.М., Танашкин С.Ф., Волчкова Е.В., Немилостива Е.А. Проблемы диагностики завозного случая лептоспироза (анализ клинического наблюдения) // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017. Т. 22, Вып. 1. С. 36–41. [Nikulina M.A., Granitov V.M., Tanashkin S.F., Volchkova E.V., Nemilostiva E.A. Problems finding imported case leptospirosis (clinical observation). *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2017, vol. 22, no. 1, pp. 36–41. (In Russ.)] doi: 10.17816/EID40969
8. Поршаков А.М., Чумачкова Е.А., Касьян Ж.А., Оглодин Е.Г., Лыонг Тхи Мо, Во Вьет Кыонг, Чинь Ван Тоан, Буй Тхи Тхань Нга. Результаты эпизоотологического обследования на чуму и другие зоонозы в северных провинциях Социалистической Республики Вьетнам весной 2019 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2020. Т. 1. С. 133–138. [Porshakov A.M., Chumachkova E.A., Kas'yan Z.A., Oglodin E.G., Mo L., Cuong V., Toan C., Nga B. Results of epizootiological survey on plague and other zoonotic infections in the northern provinces of the Socialist Republic of Vietnam during spring months of 2019. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2020, vol. 1, pp. 133–138. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2020-1-133-138
9. Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Ваганова А.Н., Грачева Л.И., Майорова С.О. Лептоспирозы: пособие для врачей / Под ред. Ю.В. Ананьиной. СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2010. 116 с. [Stoianova N.A., Tokarevich N.K., Vaganova A.N., Gracheva L.I., Mayorova S.O. Leptospirosis. A guide for medical doctors. Ed. Yu.V. Anan'ina. St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2010. 116 p. (In Russ.)]
10. Шаракшанов М.Б., Бренева Н.В., Лемешевская М.В., Бурданова Т.М., Муляр Н.Ф., Путилова Е.А., Белых К.А., Котова И.В., Киселева Е.Ю., Балахонов С.В. Клинико-эпидемиологический анализ случаев лептоспироза в Иркутской области в 2011–2015 гг. // Инфекционные болезни. 2016. Т. 14, Вып. 1. С. 73–79. [Sharakshanov M.B., Breneva N.V., Lemeshevskaya M.V., Burdanova T.M., Mulyar N.F., Putilova E.A., Belykh K.A., Kotova I.V., Kiseleva E.Y., Balakhonov S.V. Clinical and epidemiological analysis of cases of leptospirosis in the Irkutsk region in 2011–2015. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2016, vol. 14, no. 1, pp. 73–79. (In Russ.)] doi: 10.20953/1729-9225-2016-1-73-79
11. A summary report on dog and cat meat consumption in Vietnam. Research conducted by Market Strategy and Development Co, Ltd. January 2021. URL: https://media.4-paws.org/f/d/7/f/fd7fa3dec78bdccc150f917132cfec8f8d576725/FOURPAWS_Vietnamese_Consumer_Summary_Report_GB_V4.pdf
12. Anh L.T.L., Balakirev A.E., Chau N.V. Investigation of multiple infections with zoonotic pathogens of rodents in northern Vietnam. *J. Vector. Borne Dis.*, 2021, vol. 58, no. 1, pp. 47–53. doi: 10.4103/0972-9062.321750
13. Avieli N. Dog meat politics in a Vietnamese town. *Ethnology*, 2011, vol. 50, pp. 59–78. URL: https://www.researchgate.net/publication/289953306_Dog_meat_politics_in_a_Vietnamese_town
14. Bandara M., Ananda M., Wickramage K., Berger E., Agampodi S. Globalization of leptospirosis through travel and migration. *Global Health*, 2014, vol. 10: 61. doi: 10.1186/s12992-014-0061-0
15. Bharti A.R., Nally J.E., Ricaldi J.N., Matthias M.A., Diaz M.M., Lovett M.A., Levett P.N., Gilman R.H., Willig M.R., Gotuzzo E. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.*, 2003, vol. 3, pp. 757–771. doi: 10.1016/s1473-3099(03)00830-2
16. Bierque E., Thibeaux R., Girault D., Soupe-Gilbert M.-E., Goarant C. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLoS One*, 2020, vol. 15, no. 1: e0227055. doi: 10.1371/journal.pone.0227055
17. Boey K., Shiohawa K., Rajeev S. *Leptospira* infection in rats: a literature review of global prevalence and distribution. *PLoS Negl Trop. Dis.*, 2019, vol. 13, no. 8: e0007499. doi: 10.1371/journal.pntd.0007499

18. Boqvist S., Chau B.L., Gunnarsson A., Olsson Engvall E., Vågsholm I., Magnusson U. Animal- and herd-level risk factors for leptospiral seropositivity among sows in the Mekong delta, Vietnam. *Prev. Vet. Med.*, 2002, vol. 53, no. 3, pp. 233–245. doi: 10.1016/s0167-5877(01)00263-x
19. Boqvist S., Montgomery J.M., Hurst M., Thu H.T., Engvall E.O., Gunnarsson A., Magnusson U. Leptospira in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. *Vet. Microbiol.*, 2003, vol. 93, no. 4, pp. 361–368. doi: 10.1016/s0378-1135(03)00042-7
20. Boqvist S., Ho Thi V.T., Magnusson U. Annual variations in Leptospira seroprevalence among sows in southern Vietnam. *Trop. Anim. Health Prod.*, 2005, vol. 37, no. 6, pp. 443–449. doi: 10.1007/s11250-005-0300-8
21. Bui N. Vietnam Livestock Market Update Report Number: VM2021–0109, Hanoi: USDA, 2021. URL: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Vietnam%20Livestock%20Market%20Update_Hanoi_Vietnam_12-13-2021.pdf (12.05.2022)
22. Bui N., Gilleski S. Vietnam African swine fever update, in GAIN report VM9027. Hanoi: USDA, 2019. URL: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Vietnam%20African%20Swine%20Fever%20Update_Hanoi_Vietnam_11-30-2019 (12.05.2022)
23. Casanovas-Massana A., Pedra G.G., Wunder E.A. Jr., Diggle P.J., Begon M., Ko A.I. Quantification of Leptospira interrogans survival in soil and water microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2018, vol. 84, no. 13: e00507-18. doi: 10.1128/AEM.00507-18
24. Chu D.T., Ngoc T.U., Chu-Dinh T., Ngoc V.T.N., Van Nhon B., Pham V.H., Nghia L.L., Anh L.Q., Van Pham T.H., Truong N.D. The possible zoonotic diseases transferring from pig to human in Vietnam. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2019, vol. 38, no. 6, pp. 1003–1014. doi: 10.1007/s10096-018-03466-y
25. Cosson J.F., Picardeau M., Mielcarek M., Tatar C., Chaval Y., Suputtamongkol Y., Buchy P., Jittapalapong S., Herbreteau V., Morand S. Epidemiology of Leptospira transmitted by rodents in southeast Asia. *PLoS Negl Trop. Dis.*, 2014, vol. 8, no. 6: e2902. doi: 10.1371/journal.pntd.0002902
26. Costa F., Porter F.H., Rodrigues G., Farias H., de Faria M.T., Wunder E.A., Osikowicz L.M., Kosoy M.Y., Reis M.G., Ko A.I., Childs J.E. Infections by Leptospira interrogans, Seoul virus, and Bartonella spp. among Norway rats (Rattus norvegicus) from the urban slum environment in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2014, vol. 14, no. 1, pp. 33–40. doi: 10.1089/vbz.2013.1378
27. De Faria M.T., Calderwood M.S., Athanazio D.A., McBride A.J., Hartskeerl R.A., Pereira M.M., Ko A.I., Reis M.G. Carriage of Leptospira interrogans among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop.*, 2008, vol. 108, no. 1, pp. 1–5. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.07.005
28. De Lajudie P., Brygoo Er. Les leptospiroses au Viet-Nam [Leptospirosis in Viet-Nam]. *Med. Trop. (Mars)*, 1953, vol. 13, no. 4, pp. 466–481. (In French).
29. De Oliveira D., Figueira C.P., Zhan L., Pertile A.C., Pedra G.G., Gusmão I.M., Wunder E.A., Rodrigues G., Ramos E.A., Ko A.I., Childs J.E., Reis M.G., Costa F. Leptospira in breast tissue and milk of urban Norway rats (Rattus norvegicus). *Epidemiol. Infect.*, 2016, vol. 144, no. 11, pp. 2420–2429. doi: 10.1017/S0950268816000637
30. De Vries S.G., Visser B.J., Nagel I.M., Goris M.G., Hartskeerl R.A., Grobusch M.P. Leptospirosis in Sub-Saharan Africa: a systematic review. *Int. J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 28, pp. 47–64. doi: 10.1016/j.ijid.2014.06.013
31. Douchet L., Goarant C., Mangeas M., Menkes C., Hinjoy S., Herbreteau V. Unraveling the invisible leptospirosis in mainland Southeast Asia and its fate under climate change. *Sci. Total. Environ.*, 2022, vol. 832: 155018. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155018
32. Dunay S., Bass J., Stremick J. Leptospirosis: a Global Health Burden in Review. *Emerg. Med. (Los Angel)*, 2016, vol. 6, 5 p. doi: 10.4172/2165-7548.1000336
33. Feresu S.B., Bolin C.A., Korver H., Terpstra W.J. Classification of leptospirae of the pyrogenes serogroup isolated from cattle in Zimbabwe by cross-agglutinin absorption and restriction fragment length polymorphism analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1994, vol. 44, no. 3, pp. 541–546. doi: 10.1099/00207713-44-3-541
34. General Statistic Office. Results of the rural, agricultural and fishery census 2016. Hanoi: Statistic Publishing House, 2018. URL: <https://www.gso.gov.vn/wp-content/uploads/2019/03/TDT-NTNNTS-2016.pdf> (12.05.2022)
35. General Statistic Office. Statistical Summary Book of Viet Nam 2020. Date of issue: 30/06/2021. URL: <https://www.gso.gov.vn/en/data-and-statistics/2021/07/statistical-summary-book-of-viet-nam-2020> (12.05.2022)
36. Hassan L. Emerging zoonoses in domesticated livestock of Southeast Asia. Ed.: N.K. Van Alfen. Encyclopedia of agriculture and food systems. *Academic Press*, 2014, pp. 68–81. doi: 10.1016/B978-0-444-52512-3.00216-3
37. Jansen A., Luge E., Guerra B., Wittschen P., Gruber A.D., Loddenkemper C., Schneider T., Lierz M., Ehlert D., Appel B., Stark K., Nöckler K. Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, vol. 13, no. 5, pp. 739–742. doi: 10.3201/eid1305.061302
38. Jeffree M.S., Mori D., Yusof N.A., Atil A.B., Lukman K.A., Othman R., Hassan M.R., Suut L., Ahmed K. High incidence of asymptomatic leptospirosis among urban sanitation workers from Kota Kinabalu, Sabah, Malaysian Borneo. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, no. 1: 19442. doi: 10.1038/s41598-020-76595-0
39. Kim S.H., Jang J.Y. Correlations between climate change-related infectious diseases and meteorological factors in Korea. *J. Prev. Med. Public Health*, 2010, vol. 43, no. 5, pp. 436–444. (In Korean). doi: 10.3961/jpmph.2010.43.5.436
40. Kitaoka M., Duong H.M., Mori M., Mo D.H. Identification of Leptospira strains isolated from rats in Saigon as Leptospira bataviae or its subserotype. *Int. J. Zoonoses*, 1977, vol. 4, no. 1, pp. 45–47.
41. Koizumi N., Morita M., Pheng V., Wann C., Masuoka H., Higa Y., Wada T., Hirayama K., Ohnishi M., Miura K. Rat trade and leptospirosis: Molecular epidemiology of Leptospira species in rats exported from Cambodia to Vietnam. *Transbound Emerg. Dis.*, 2022, vol. 69, no. 3, pp. 1641–1648. doi: 10.1111/tbed.14077
42. Koizumi N., Miura K., Sanai Y., Takemura T., Ung T.T.H., Le T.T., Hirayama K., Hasebe F., Nguyen H.L.K., Hoang P.V.M., Nguyen C.N., Khong T.M., Le M.T.Q., Hoang H.T.T., Ohnishi M. Molecular epidemiology of Leptospira interrogans in Rattus norvegicus in Hanoi, Vietnam. *Acta Trop.*, 2019, vol. 194, pp. 204–208. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.02.008
43. Koizumi N., Izumiya H., Mu J.J., Arent Z., Okano S., Nakajima C., Suzuki Y., Mizutani Muto M., Tanikawa T., Taylor K.R., Komatsu N., Yoshimatsu K., Thi Thu Ha H., Ohnishi M. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Leptospira interrogans and Leptospira borgpetersenii isolated from small feral and wild mammals in East Asia. *Infect. Genet. Evol.*, 2015, vol. 36, pp. 434–440. doi: 10.1016/j.meegid.2015.08.013

44. Koma T., Yoshimatsu K., Yasuda S.P., Li T., Amada T., Shimizu K., Isozumi R., Mai L.T., Hoa N.T., Nguyen V., Yamashiro T., Hasebe F., Arikawa J. A survey of rodent-borne pathogens carried by wild *Rattus* spp. in Northern Vietnam. *Epidemiol. Infect.*, 2013, vol. 141, no. 9, pp. 1876–1884. doi: 10.1017/S0950268812002385
45. Kutsuna S., Kato Y., Koizumi N., Yamamoto K., Fujiya Y., Mawatari M., Takeshita N., Hayakawa K., Kanagawa S., Ohmagari N. Travel-related leptospirosis in Japan: a report on a series of five imported cases diagnosed at the National Center for Global Health and Medicine. *J. Infect. Chemother.*, 2015, vol. 21, no. 3, pp. 218–223. doi: 10.1016/j.jiac.2014.10.004
46. Laras K., Cao B.V., Bounlu K., Nguyen T.K., Olson J.G., Thongchanh S., Tran N.V., Hoang K.L., Punjabi N., Ha B.K., Ung S.A., Insisiengmay S., Watts D.M., Beecham H.J., Corwin A.L. The importance of leptospirosis in Southeast Asia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2002, vol. 67, no. 3, pp. 278–286. doi: 10.4269/ajtmh.2002.67.278
47. Lau C., Smythe L., Craig S., Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: Fuelling the fire? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2010, vol. 104, pp. 631–638. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.07.002
48. Lee H.S., Bui V.N., Nguyen H.X., Bui A.N., Hoang T.D., Nguyen-Viet H., Grace Randolph D., Wieland B. Seroprevalences of multi-pathogen and description of farm movement in pigs in two provinces in Vietnam. *BMC Vet. Res.*, 2020, vol. 16, no. 1: 15. doi: 10.1186/s12917-020-2236-7
49. Lee H.S., Khong N.V., Xuan H.N., Nghia V.B., Nguyen-Viet H., Grace D. Sero-prevalence of specific *Leptospira* serovars in fattening pigs from 5 provinces in Vietnam. *BMC Vet Res.*, 2017, vol. 13, no. 1: 125. doi: 10.1186/s12917-017-1044-1
50. Lee H.S., Thanh T.L., Ly N.K., Nguyen-Viet H., Thakur K.K., Grace D. Seroprevalence of leptospirosis and Japanese encephalitis in swine in ten provinces of Vietnam. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 8: e0214701. doi: 10.1371/journal.pone.0214701
51. Lemke U., Mergenthaler M., Roessler R., Le Thi Thanh H., Herold P., Kaufmann B., Zárate A. Pig production in Vietnam — a review. *CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources*, 2008, vol. 23, 15 p. doi: 10.1079/PAVSNNR20083023
52. Loan H.K., Van Cuong N., Takhampunya R., Kiet B.T., Campbell J., Them L.N., Bryant J.E., Tippayachai B., Van Hoang N., Morand S., Hien V.B., Carrique-Mas J.J. How important are rats as vectors of leptospirosis in the Mekong Delta of Vietnam? *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2015, vol. 15, no. 1, pp. 56–64. doi: 10.1089/vbz.2014.1613
53. Lu L.C., Chiu S.Y., Chiu Y.H., Chang T.H. Sustainability efficiency of climate change and global disasters based on greenhouse gas emissions from the parallel production sectors — a modified dynamic parallel three-stage network DEA model. *J. Environ. Manage*, 2022, vol. 317: 115401. doi: 10.1016/j.jenvman.2022.115401
54. Mai L.T.P., Dung L.P., Mai T.N.P., Hanh N.T.M., Than P.D., Tran V.D., Quyet N.T., Hai H., Ngoc D.B., Hai P.T., Hoa L.M., Thu N.T., Duong T.N., Anh D.D. Characteristics of human leptospirosis in three different geographical and climatic zones of Vietnam: a hospital-based study. *Int. J. Infect. Dis.*, 2022, vol. 120, pp. 113–120. doi: 10.1016/j.ijid.2022.04.011
55. Mai L.T.P., Dung L.P., Than P.D., Dinh T.V., Quyet N.T., Hai H., Mai T.N.P., Hanh N.T.M., Ly N.K. *Leptospira* infection among human-close-contact animals in different geographical areas in Vietnam. *Sci. Prog.*, 2021, vol. 104, no. 3: 368504211031747. doi: 10.1177/00368504211031747
56. Martins G., Loureiro A.P., Hamond C., Pinna M.H., Bremont S., Bourhy P., Lilenbaum W. First isolation of *Leptospira noguchii* serogroups Panama and Autumnalis from cattle. *Epidemiol. Infect.*, 2015, vol. 143, no. 7, pp. 1538–1541. doi: 10.1017/S0950268814002416
57. Mishima N., Tabuchi K., Kuroda T., Nakatani I., Lamaningao P., Miyake M., Kanda S., Koizumi N., Nishiyama T. The first case in Japan of severe human leptospirosis imported from Vietnam. *Trop. Med. Health*, 2013, vol. 41, no. 4, pp. 171–176. doi: 10.2149/tmh.2013-04
58. Muoi N.T.B., Thu H.T.V. Survey on *Leptospira* infection rate in rats (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*) in Kien Giang province. *Sci. J. Cantho Univ.*, 2016, vol. 2: 4.
59. Panti-May J.A., De Andrade R.R.C., Gurubel-González Y., Palomo-Arjona E., Sodá-Tamayo L., Meza-Sulú J., Ramírez-Sierra M., Dumonteil E., Vidal-Martínez V.M., Machain-Williams C., De Oliveira D., Reis M.G., Torres-Castro M.A., Robles M.R., Hernández-Betancourt S.F., Costa F. A survey of zoonotic pathogens carried by house mouse and black rat populations in Yucatan, Mexico. *Epidemiol. Infect.*, 2017, vol. 145, no. 11, pp. 2287–2295. doi: 10.1017/S0950268817001352
60. Pappas G., Papadimitriou P., Siozopoulou V., Christou L., Akritidis N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int. J. Infect. Dis.*, 2008, vol. 12, no. 4, pp. 351–357. doi: 10.1016/j.ijid.2007.09.011
61. Patel J.M., Vihol P.D., Prasad M.C., Kalyani I.H., Raval J.K., Patel K.M., Thirumalesh S.R.A., Balamurugan V. Seroepidemiological pattern of leptospirosis in bovine of South Gujarat, India. *Veterinary World*, 2014, vol. 7, no. 11, pp. 999–1003. doi: 10.14202/vetworld.2014.999-1003
62. Pellizzaro M., Conrado F.O., Martins C.M., Joaquim S.F., Ferreira F., Langoni H., Biondo A.W. Serosurvey of *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* in rats captured from two zoos in Southern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2017, vol. 50, no. 6, pp. 857–860. doi: 10.1590/0037-8682-0138-2017
63. Pham-Thanh L., Nhu T.V., Nguyen T.V., Tran K.V., Nguyen K.C., Nguyen H.T., Hoa N.T., Padungtod P. Zoonotic pathogens and diseases detected in Vietnam, 2020–2021. *One Health*, 2022, vol. 14: 100398. doi: 10.1016/j.onehlt.2022.100398
64. Rahman M.H.A.A., Hairon S.M., Hamat R.A., Jamaluddin T.Z.M.T., Shafei M.N., Idris N., Osman M., Sukeri S., Wahab Z.A., Mohammad W.M.Z.W., Idris Z., Daud A. Seroprevalence and distribution of leptospirosis serovars among wet market workers in northeastern, Malaysia: a cross sectional study. *BMC Infect. Dis.*, 2018, vol. 18, no. 1: 569. doi: 10.1186/s12879-018-3470-5
65. Ricaldi J.N., Vinetz J.M. Leptospirosis in the tropics and in travelers. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 2006, vol. 8, no. 1, pp. 51–58. doi: 10.1007/s11908-006-0035-3
66. Rice. The Observatory of Economic Complexity (OEC). URL: <https://oec.world/en/profile/hs/rice> (12.05.2022)
67. Ridzuan J.M., Aziah B.D., Zahiruddin W.M. Study on seroprevalence and leptospiral antibody distribution among high-risk planters in Malaysia. *Osong Public Health Res. Perspect*, 2016, vol. 7, no. 3, pp. 168–171. doi: 10.1016/j.phrp.2016.04.006
68. Romero E.C., Bernardo C.C., Yasuda P.H. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 2003, vol. 45, no. 5, pp. 245–248. doi: 10.1590/s0036-46652003000500002
69. Samir A., Soliman R., El-Hariri M., Abdel-Moein K., Hatem M.E. Leptospirosis in animals and human contacts in Egypt: broad range surveillance. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2015, vol. 48, no. 3, pp. 272–277. doi: 10.1590/0037-8682-0102-2015

70. Schneider A.G., Casanovas-Massana A., Hacker K.P., Wunder E.A. Jr., Begon M., Reis M.G., Childs J.E., Costa F., Lindow J.C., Ko A.I. Quantification of pathogenic *Leptospira* in the soils of a Brazilian urban slum. *PLoS Negl Trop. Dis.*, 2018, vol. 12, no. 4: e0006415. doi: 10.1371/journal.pntd.0006415
71. Sethi S., Sharma N., Kakkar N., Taneja J., Chatterjee S.S., Banga S.S., Sharma M. Increasing trends of leptospirosis in northern India: a clinico-epidemiological study. *PLoS Negl Trop. Dis.*, 2010, vol. 4, no. 1: e579. doi: 10.1371/journal.pntd.0000579
72. Thai K.T., Binh T.Q., Giao P.T., Phuong H.L., Hung le Q., Van Nam N., Nga T.T., Goris M.G., de Vries P.J. Seroepidemiology of leptospirosis in southern Vietnamese children. *Trop. Med. Int. Health*, 2006, vol. 11, no. 5, pp. 738–745. doi: 10.1111/j.1365-3156.2006.01619.x
73. Thai K.T., Nga T.T., Phuong H.L., Giao P.T., Hung le Q., Binh T.Q., Van Nam N., Hartskeerl R.A., de Vries P.J. Seroepidemiology and serological follow-up of anti-leptospires IgG in children in Southern Vietnam. *Acta Trop.*, 2008, vol. 106, no. 2, pp. 128–131. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.02.005
74. Thibeaux R., Bierque E., Soupé-Gilbert M.E., Girault D., Guentas L., Goarant C. *Leptospira interrogans* retains direct virulence after long starvation in water. *Curr. Microbiol.*, 2020, vol. 77, no. 10, pp. 3035–3043. doi: 10.1007/s00284-020-02128-7
75. Thibeaux R., Geroult S., Benezech C., Chabaud S., Soupé-Gilbert M.E., Girault D., Bierque E., Goarant C. Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. *PLoS Negl Trop. Dis.*, 2017, vol. 11, no. 2: e0005414. doi: 10.1371/journal.pntd.0005414
76. Thibeaux R., Girault D., Bierque E., Soupé-Gilbert M.E., Rettinger A., Douyère A., Meyer M., Iraola G., Picardeau M., Goarant C. Biodiversity of environmental *Leptospira*: improving identification and revisiting the diagnosis. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 1, no. 9: 816. doi: 10.3389/fmicb.2018.00816
77. Thibeaux R., Iraola G., Ferrés I., Bierque E., Girault D., Soupé-Gilbert M.E., Picardeau M., Goarant C. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microb. Genom.*, 2018, vol. 4, no. 1: e000144. doi: 10.1099/mgen.0.000144
78. Tonin A.A., Krawczak F. da S., Noll J.C.G., Tochetto C., Martins J.L.R., Badke M.R.T., Labruna M.B., Silva A.S.D. *Leptospira* seroprevalence in capybaras from a Brazilian urban area. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2016, vol. 44, no. 1: 5. doi: 10.22456/1679-9216.81100
79. Tran V.D., Mai L.T.P., Thu N.T., Linh B.K., Than P.D., Quyet N.T., Dung L.P., Mai T.N.P., Hanh N.T.M., Hai H., Duong T.N., Anh D.D. Seroprevalence and serovar distribution of Leptospirosis among healthy people in Vietnam: results from a multi-center study. *Clin. Epidemiol. Glob. Health*, 2021, vol. 10: 100700. doi: 10.1016/j.cegh.2021.100700
80. Vale-Gonçalves H.M., Cabral J.A., Faria M.C., Nunes-Pereira M., Faria A.S., Veloso O., Vieira M.L., Paiva-Cardoso M.N. Prevalence of *Leptospira* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) from Northern Portugal: risk factor analysis. *Epidemiol. Infect.*, 2015, vol. 143, no. 10, pp. 2126–2130. doi: 10.1017/S0950268814003331
81. Van C.T., Thuy N.T., San N.H., Hien T.T., Baranton G., Perolat P. Human leptospirosis in the Mekong delta, Viet Nam. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1998, vol. 92, no. 6, pp. 625–628. doi: 10.1016/s0035-9203(98)90787-8
82. Vaucel M. Le serodiagnostic de Martin et Pettit au Tonkin. Resultats de 800 sero-agglutinations. *Bull. Soci. Patholog. Exotique*, 1936, vol. 29, pp. 251–257.
83. Victoriano A.F., Smythe L.D., Gloriani-Barzaga N., Cavinta L.L., Kasai T., Limpakarnjanarat K., Ong B.L., Gongal G., Hall J., Coulombe C.A., Yanagihara Y., Yoshida S., Adler B. Leptospirosis in the Asia Pacific region. *BMC Infect. Dis.*, 2009, vol. 9: 147. doi: 10.1186/1471-2334-9-147
84. Vietnam Health Statistics Yearbook 2018. Hanoi, Viet Nam: Ministry of Health (Vietnam), 2020. URL: https://moh.gov.vn/documents/176127/0/NGTK+2018+final_2018.pdf/29980c9e-d21d-41dc-889a-fb0e005c2ce9 (12.05.2022)
85. Vietnam's rice production in 2021 increased by 1.1 million tons. Ministry of Agriculture and Rural Development of the Socialist Republic of Vietnam. Ed.: Ngo The Hien. 05.01.2022. URL: <https://www.mard.gov.vn/en/Pages/vietnam%E2%80%99s-rice-production-in-2021-increased-by-1-1-million-tons.aspx> (12.05.2022)
86. Villanueva S.Y., Saito M., Baterna R.A., Estrada C.A., Rivera A.K., Dato M.C., Zamora P.R., Segawa T., Cavinta L.L., Fukui T., Masuzawa T., Yanagihara Y., Gloriani N.G., Yoshida S. *Leptospira*-rat-human relationship in Luzon, Philippines. *Microbes Infect.*, 2014, vol. 16, no. 11, pp. 902–910. doi: 10.1016/j.micinf.2014.07.001
87. Yuen K.W., Hanh T.T., Quynh V.D., Switzer A.D., Teng P., Lee J.S.H. Interacting effects of land-use change and natural hazards on rice agriculture in the Mekong and Red River deltas in Vietnam. *Nat. Hazards Earth Syst. Sci.*, 2021, vol. 21, pp. 1473–1493. doi: 10.5194/nhess-21-1473-2021
88. Yun C.H. Editorial — Unforeseen enemy: African swine fever. *Asian-Australas J. Anim. Sci.*, 2020, vol. 33, no. 1, pp. 1–3. doi: 10.5713/ajas.2020.0001ED

Авторы:

Токаревич Н.К., д.м.н., профессор, зав. лабораторией зооантропонозных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Блинова О.В., к.х.н., младший научный сотрудник лаборатории зооантропонозных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Tokarevich N.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Blinova O.V., PhD (Chemistry), Junior Researcher, Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 22.06.2022
 Принята к печати 23.08.2022

Received 22.06.2022
 Accepted 23.08.2022

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ТЕЧЕНИЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ФОНЕ ПАНДЕМИИ COVID-19. СООБЩЕНИЕ 2. РЕАЛИЗАЦИЯ ИНТЕРФЕРЕНЦИИ МЕЖДУ SARS-CoV-2 И ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ*

Е.В. Боева^{1,2}, Н.А. Беляков^{1,2}, О.Е. Симакина², Д.М. Даниленко³, Д.А. Лиознов^{1,3}

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

² ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородиной Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В настоящее время продолжает представлять особый интерес заболевание, вызванное новым корона-вирусом (COVID-19), и возможность в условиях сложившейся эпидемической ситуации сочетанного инфицирования SARS-CoV-2 и другими патогенами. В обзоре, основанном на анализе литературных и собственных материалов, изложены особенности взаимоотношений SARS-CoV-2 и возбудителей острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ). Особое внимание уделено сочетанному течению COVID-19 и гриппа, сравнительной характеристике тяжести клинической картины. Оценка эпидемической обстановки на фоне пандемии COVID-19 на территории зарубежных стран и Российской Федерации (РФ) позволила выявить наличие феномена интерференции SARS-CoV-2 с другими вирусными респираторными агентами, основанного на фактах резкого угнетения циркуляции вирусов гриппа, респираторно-синцитиального вируса (РСВ) и других возбудителей ОРВИ в период активного распространения пандемического коронавируса. Сопоставлены основные эпидемиологические показатели течения коронавирусной инфекции и оценен вклад различных возбудителей в этиологию ОРВИ в ходе развития второй волны COVID-19 в РФ. Отмечено, что снижение числа новых случаев в 11,4 и летальных исходов в 2,1 раза вследствие COVID-19 на 6 и 13 неделе 2022 г. происходило при неизменных показателях лабораторного обнаружения вируса гриппа (0,8%) и увеличении частоты выявления возбудителей других ОРВИ. Результаты наблюдений показали, что на фоне снижения заболеваемости COVID-19, не последовало увеличение доли диагностированных случаев инфекций, вызванных другими па-

* Сообщение 1 опубликовано в № 4 журнала «Инфекция и иммунитет» за 2022 г.

Адрес для переписки:

Боева Екатерина Валериевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 911 792–91-94.
E-mail: kathrine.boeva@gmail.com

Contacts:

Ekaterina V. Boeva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 911 792–91-94.
E-mail: kathrine.boeva@gmail.com

Для цитирования:

Боева Е.В., Беляков Н.А., Симакина О.Е., Даниленко Д.М., Лиознов Д.А. Эпидемиология и течение инфекционных заболеваний на фоне пандемии COVID-19. Сообщение 2. Реализация интерференции между SARS-CoV-2 и возбудителями острых респираторных вирусных инфекций // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1029–1039. doi: 10.15789/2220-7619-EAC-1960

Citation:

Boeva E.V., Belyakov N.A., Simakina O.E., Danilenko D.M., Lioznov D.A. Epidemiology and course of infectious diseases during the Covid-19 pandemic. Report 2. Interference engaged between SARS-CoV-2 and acute respiratory viral infections // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1029–1039. doi: 10.15789/2220-7619-EAC-1960

тогенами, особенно гриппом. Полученные результаты подтверждают необходимость обеспечения эффективного эпидемиологического надзора и дополнительного применения методов идентификации возбудителей для мониторинга различных ОРВИ, которые могут существенно повлиять на подход к дифференциальной диагностике, на тактику ведения пациентов и принятие решения о надлежащих профилактических мерах.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, острые респираторные вирусные инфекции, вирус гриппа, эпидемиология, синдемия, интерференция.

EPIDEMIOLOGY AND COURSE OF INFECTIOUS DISEASES DURING THE COVID-19 PANDEMIC. REPORT 2. INTERFERENCE ENGAGED BETWEEN SARS-CoV-2 AND ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS

E.V. Boeva^{a,b}, Belyakov N.A.^{a,b}, Simakina O.E.^b, Danilenko D.M.^c, Lioznov D.A.^{a,c}

^a Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

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

^c Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Currently, the disease caused by the new coronavirus (COVID-19) and the possibility of co-infection with SARS-CoV-2 and other pathogens in the current epidemic situation continues to be of particular interest. The review, based on the analysis of literature and own materials, outlines the features of the relationship between SARS-CoV-2 and pathogens of acute respiratory viral infections (ARVI). Particular attention is paid to the combined course of COVID-19 and influenza, a comparative characteristic of the severity of the clinical picture. An assessment of the epidemic situation against the backdrop of the COVID-19 pandemic in foreign countries and the Russian Federation (RF) revealed the presence of the phenomenon of SARS-CoV-2 interference with other viral respiratory agents, based on the facts of a sharp suppression of the circulation of influenza viruses, respiratory syncytial virus (RSV) and other ARVI pathogens during the period of active spread of pandemic coronavirus. The main epidemiological indicators of the course of coronavirus infection were compared and the contribution of various pathogens to the etiology of acute respiratory viral infections during the development of the second wave of COVID-19 in the RF was assessed. It was noted that the decrease in the number of new cases by 11.4 and deaths by 2.1 times due to COVID-19 at 6 and 13 weeks in 2022 occurred with unchanged laboratory detection of the influenza virus (0.8%) and an increase in the frequency detection of pathogens of other SARS. The results of observations showed that against the background of a decrease in the incidence of COVID-19, there was no increase in the proportion of diagnosed cases of infections caused by other pathogens, especially influenza. The results obtained confirm the need to ensure effective epidemiological surveillance and additional application of pathogen identification methods for monitoring various ARVI, which can significantly affect the approach to differential diagnosis, patient management tactics and the decision on appropriate preventive measures.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, acute respiratory viral infections, influenza virus, epidemiology, syndemia, interference.

Введение

Процессы синергии и интерференции среди микроорганизмов являются неотъемлемой частью их существования, предопределяющие приспособление и эволюцию возбудителей различных заболеваний [9]. Ранее были рассмотрены особенности взаимного влияния социально значимых и новой коронавирусной инфекций (COVID-19) [4]. В условиях сложившейся эпидемической ситуации продолжает представлять особый интерес возможность сочетанного течения заболеваний, обусловленных SARS-CoV-2 и другими респираторными вирусами, или, напротив, конкурентного контрсиндемического взаимодействия между ними. Понимание данных закономерностей способно существенно повлиять на подход к дифференциальной диагностике и определению тактики ведения пациентов [7, 10, 14, 17, 27].

Оценка синергического взаимодействия вируса гриппа и SARS-CoV-2

За короткое время человечество пережило две пандемии: вируса гриппа А (H1N1) в 2009 г. и новой коронавирусной инфекции (COVID-19), которая продолжается по сей день. Оба возбудителя относятся к РНК-содержащим вирусам, однако, несмотря на схожесть клинической картины, каждый из них проявляет особую тропность к дыхательному эпителию и использует уникальные поверхностные белки для инфицирования клеток хозяина. Кроме того, существуют отличия в вирулентности данных инфекционных агентов, доступности лечения и возможностях их специфической иммунопрофилактики [1, 4].

Наличие разных клеточных мишеней не исключает возможности совместной циркуляции

SARS-CoV-2 и вируса гриппа, поэтому можно справедливо предположить, что они способны находиться в синергическом взаимодействии.

Считается, что пожилые люди и пациенты с сопутствующими заболеваниями (например, с патологиями сердечно-сосудистой и дыхательной систем) подвержены более высокому риску осложнений, связанных с COVID-19 или гриппом, а лица с ослабленным иммунитетом — более высокому риску тяжелого течения COVID-19 [30].

Существуют данные о том, что на конец 2020 г. половина случаев COVID-19 в г. Ухань была обусловлена сочетанным инфицированием вирусом гриппа [22]. Предполагается, что циркуляция вируса гриппа в течение недели, предшествовавших вспышке в Западной Европе, могла «скрыть» начало распространения SARS-CoV-2 внутри сообщества [19].

До сих пор ведутся дискуссии о различиях тяжести клинической картины при COVID-19 и гриппе. В 2021 г. в Германии был проведен анализ исходов госпитализации пациентов с COVID-19 и гриппом. В исследование было включено более 2 тыс. госпитализированных пациентов с COVID-19 и свыше 6 тыс. человек с гриппом. При обоих заболеваниях пациенты старше 49 лет составляли почти три четверти госпитальных случаев, а гипертензия, сахарный диабет, хроническая болезнь почек и хроническая обструктивная болезнь легких были наиболее распространенными сопутствующими заболеваниями. Общая внутрибольничная летальность была более чем в 2 раза выше при COVID-19 по сравнению с гриппом (14% против 6%). Полученные данные согласуются с результатами крупного французского исследования, где уровень внутрибольничной летальности составил 16,9% для COVID-19 и 5,8% для гриппа, а потребность в госпитализации в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) была выше у пациентов с COVID-19 (16,3%), чем у инфицированных гриппом (10,8%) [24].

Напротив, другие авторы полагали, что в показателе госпитальной летальности между больными тяжелой формой COVID-19 и пациентами с гриппом отсутствует существенная разница. У заболевших гриппом в тяжелой форме общее состояние здоровья до болезни и прогноз заболевания были хуже, чем у пациентов с COVID-19. Было отмечено, что развитие вторичной бактериальной инфекции, острой почечной недостаточности, повышение показателя прокальцитонина выше 2,0 нг/мл являлись независимыми факторами, отличавшими грипп от COVID-19. Стоит отметить, что в обоих исследованиях, авторы не указывали временной период набора материала, так как клиническая картина COVID-19 может претер-

певать метаморфозу в зависимости от штамма SARS-CoV-2. Также общая выборка во втором докладе значительно уступала по количеству пациентов и составляла 109 человек [18, 20].

Интерференция между возбудителями ОРВИ и SARS-CoV-2

Существуют противоположные мнения о том, что пандемия COVID-19 в значительной степени повлияла на эпидемиологию вируса гриппа и респираторно-синцитиального вируса (РСВ) в сторону снижения их циркуляции. Данные систем респираторного надзора в Китае, Англии и США показали значительное снижение заболеваемости гриппом за последние пять лет в среднем на 92–99% в сезоне 2020–2021 гг. Для понимания причин произошедшего китайские ученые прибегли к созданию модели и установлению роли ограничительных мероприятий в профилактике ОРВИ. Результаты проведенного исследования показали, что ношение масок, в том числе недолгосрочное — в течении нескольких недель в пике подъема заболеваемости, — само по себе может существенно снизить активность гриппа. Этот положительный эффект усиливается в условиях организации кампании по вакцинопрофилактике. Тем временем вмешательство в миграционные процессы и мобильность населения в меньшей мере повлияли на частоту выявления вируса гриппа [6, 28].

Яркую тенденцию к снижению заболеваемости гриппом демонстрирует ретроспективное китайское исследование, в которые были включены пациенты, прошедшие тестирование на вирусы гриппа А и В с ноября 2017 г. по март 2021 г. Было проведено 14 902, 14 762, 25 070 и 1107 тестирований на вирусы гриппа А и В за четыре временных периода, при общем количестве положительных результатов 32,45, 35,77, 29,40 и 0,54% соответственно. За два периода четырех сезонов гриппа, с ноября по январь общее количество подтвержденных случаев гриппа составило 8530, 4980, 22 925, 868; с февраля по март это количество составило 6372, 9782, 2145, 239 (табл. 1) [22].

Общее количество тестов и процент положительных результатов значительно снизились с февраля/марта сезона 2019/2020, что совпало с началом COVID-19 (рис. 1).

Отметим, что данное исследование имело несколько ограничений. Во-первых, оно было ретроспективным, во-вторых, полученные данные анализировались на территории одного города, поэтому, возможно, преждевременно экстраполировать эти результаты на всю страну. Однако и другие публикации продемонстрировали аналогичные результаты. В своей работе

Таблица 1. Соотношение проведенных ОТ-ПЦР тестирований на грипп А/В и положительных результатов в сезонах заболеваемости с 2017/2018 по 2020/2021 в Китае (г. Нинбо) [22]

Table 1. A ratio between influenza A/B RT-PCR assays and positive samples in the years 2017/2018–2020/2021 in China (city of Ningbo) [22]

Показатели Parameter	2017/2018 n = 14 902	2018/2019 n = 14 762	2019/2020 n = 25 070	2020/2021 n = 1107	P
Возраст/Age	27,1±26,9	30,0±25,8	22,0±21,3	40,0±27,2	0,889
≤ 16 лет/≤ 16 years old	8038 (53,9%)	7913 (53,6%)	15 569 (62,1%)	325 (29,4%)	< 0,01
> 16 лет/> 16 years old	6864 (46,1%)	6849 (46,4%)	9501 (37,9%)	782 (70,6%)	
Пол/Sex					0,991
Мужчины/Males	7087 (47,6%)	6942 (47%)	12 312 (49,1%)	549 (49,6%)	
Женщины/Females	7815 (52,4%)	7820 (53%)	12 758 (50,9%)	558 (50,4%)	
Количество образцов/Number of samples					< 0,01
Положительные/Positive	4836 (32,5%)	5290 (35,8%)	7515 (30%)	6 (0,5%)	
Отрицательные/Negative	10 066 (67,6%)	9472 (64,2%)	17 555 (70%)	1101 (99,5%)	
Вирусы гриппа/Influenza viruses					< 0,01
А	7484	9977	12 729	650	
Положительный результат/Positive result	2630 (35,1%)	5006 (50,2%)	4159 (32,7%)	3 (0,5%)	
В	7418	4785	12 341	457	
Положительный результат/Positive result	2206 (29,7%)	274 (5,7%)	3212 (26%)	3 (0,7%)	

Stamm и соавт. отметили, что на фоне пандемии COVID-19 не только уменьшилось число новых случаев гриппа, но и РСВ. Такое снижение наблюдалось и в других странах [10, 28].

Ранее эпидемии гриппа и РСВ являлись причиной высокой заболеваемости и смертности за рубежом. В Западной Австралии сообщалось о снижении на 98–99% случаев выявления РСВ и гриппа в 2020 г. по сравнению с предыдущими зимними сезонами с 2012 по 2019 гг. Точно так же в Новом Южном Уэльсе количество выявленных случаев РСВ в период с апреля по июнь 2020 г. было на 94,3% ниже, чем прогнозировалось на основе сравнения с 2015–2019 гг. В Европе во время обычного подъема заболеваемости сезонными бронхолитами и гриппом в первые месяцы зимы наблюдалась аналогичная картина. Также неспецифические меры профилактики привели к снижению числа случаев госпитализации с РСВ и гриппом детей в Чили и Южной Африке. Полученные данные подчеркивают потенциальную недооценку роли взрослых в распространении вспышек РСВ и, возможно, других вирусных эпидемий [13, 29].

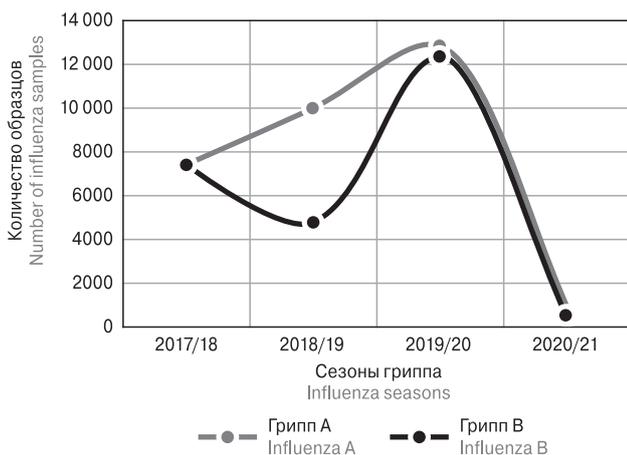
**Рисунок. Количество регистрируемых положительных образцов на вирус гриппа в Китае (г. Нинбо) с 2017/2018 по 2020/2021 сезоны [22]**

Figure. Number of influenza positive samples in the years 2017/2018–2020/2021 in China (city of Ningbo) [22]

лось о снижении на 98–99% случаев выявления РСВ и гриппа в 2020 г. по сравнению с предыдущими зимними сезонами с 2012 по 2019 гг. Точно так же в Новом Южном Уэльсе количество выявленных случаев РСВ в период с апреля по июнь 2020 г. было на 94,3% ниже, чем прогнозировалось на основе сравнения с 2015–2019 гг. В Европе во время обычного подъема заболеваемости сезонными бронхолитами и гриппом в первые месяцы зимы наблюдалась аналогичная картина. Также неспецифические меры профилактики привели к снижению числа случаев госпитализации с РСВ и гриппом детей в Чили и Южной Африке. Полученные данные подчеркивают потенциальную недооценку роли взрослых в распространении вспышек РСВ и, возможно, других вирусных эпидемий [13, 29].

Течение сезонных эпидемий гриппа и ОРВИ в период пандемии COVID-19 в Российской Федерации

Реализация процесса интерференции четко прослежена на примере угнетения новым коронавирусом сезонных эпидемий гриппа и острых респираторных вирусных инфекций в течение двух лет в России, начиная с осени 2020 г. Проведем сравнение результатов ПЦР-диагностики в базовых лабораториях

двух НЦГ ВОЗ в РФ на 6 (пик заболеваемости COVID-19) и 13 неделе (спад заболеваемости COVID-19) 2022 г. В период спада заболеваемости COVID-19 частота диагностирования ОРВИ негриппозной этиологии (парагрипп, аденовирусная, респираторно-синцитиальная, коронавирусная, бокавирусная, метапневмовирусная и риновирусная инфекции) составила по результатам молекулярно-генетического анализа

10,2%, а по результатам ИФА (парагрипп, аденовирусная и респираторно-синцитиальная инфекции) — 14,6% (табл. 2, 3). В то же время в пик заболеваемости COVID-19 частота диагностирования негриппозных ОРВИ была существенно ниже и составила 4,0% по результатам ПЦР и 12,9% — методом ИФА (табл. 2) [3].

В табл. 3 сопоставлены эпидемиологические показатели течения COVID-19 (число новых

Таблица 2. Результаты ПЦР-диагностики в базовых лабораториях двух НЦГ ВОЗ в РФ за 13 неделю 2022 г.

Table 2. PCR diagnostic data obtained in the two WHO National Influenza Centres in Russian Federation on week 13, 2022

Возбудители ОРВИ ARVI pathogens	Число образцов/число положительных Number of samples/ number of positive samples	% положит. % positive
Грипп (3722 протестированных образца)/Influenza (3722 tested samples)		
Грипп А (не субт.)/Influenza A (no subtypes)	5	0,1
Грипп А(H1)pdm09/Influenza A(H1)pdm09	0	0,0
Грипп А(H3)/Influenza A(H3)	1	0,03
Грипп В/Influenza B	23	0,6
Весь грипп/Total Influenza-positive	29	0,8
Другие ОРВИ (3584 протестированных образца)/Other ARVI (3584 tested samples)		
Парагрипп/Parainfluenza	43	1,2
Аденовирус/Adenovirus	70	2,0
РС-вирус/RSV	40	1,1
Риновирус/Rhinovirus	133	3,7
Коронавирус/Coronavirus	54	1,5
Метапневмовирус/Metapneumovirus	15	0,4
Бокавирус/Bocavirus	10	0,3
Все ОРВИ/Total ARVI	365	10,2
SARS-CoV-2 (15 560 протестированных образцов)/SARS-CoV-2 (15 560 tested samples)	2997	19,3

Таблица 3. Сопоставление количества новых выявленных случаев заболевания COVID-19, другими ОРВИ и смертей от COVID-19 в РФ

Table 3. Comparing the number of newly detected cases of COVID-19, other acute respiratory viral infections and COVID-19-related death rate in the Russian Federation

Основные показатели Major parameters	6 неделя Week 6	13 неделя Week 13	19 неделя Week 19
Число лиц, заболевших COVID-19 (U07.1) за сутки Number of people with COVID-19 (U07.1) per day	203 767	17 949	5047
Число лиц, умерших от COVID-19 (U07.1) за сутки Number of people died from COVID-19 (U07.1) per day	729	342	99
COVID-19, %	67,2	19,3	11,3
ОРВИ, %/ARVI, %	4,0	10,2	15
Грипп, %/Influenza, %	0,8	0,8	1

Таблица 4. Вклад различных возбудителей в этиологию ОРВИ в ходе развития второй волны COVID-19 в РФ
 Table 4. Prevalence of various pathogens in ARVI etiology during developing the second COVID-19 wave in the Russian Federation

Год Year	Неделя Week	Частота детекции вирусов Frequency of virus detection									
		Грипп типа А и В Influenza type A and B	Парагрипп Parainfluenza	Аденовирус Adenovirus	РСВ RSV	Риновирус Rhinovirus	Коронавирус Coronavirus	Метапневмовирус Metapneumovirus	Бокавирус Bocavirus	SARS-CoV-2	
2020	36	0,0	0,5	0,5	0,2	13,0	0,1	0,0	0,3	9,5	
	37	0,0	1,0	0,2	0,3	21,1	0,2	0,1	0,1	5,1	
	38	0,0	1,6	0,8	0,3	25,3	0,5	0,1	0,1	5,3	
	39	0,0	0,9	0,3	0,2	21,4	0,4	0,2	0,1	6,4	
	40	0,0	1,4	0,4	1,1	14,6	0,2	0,1	0,0	15,2	
	41	0,0	1,5	1,0	0,1	13,0	0,3	0,3	0,5	14,9	
	42	0,0	0,9	0,9	0,1	9,6	0,2	0,1	0,4	15,3	
	43	0,0	1,1	0,8	0,1	9,3	0,6	0,2	0,4	19,2	
	44	0,0	0,8	0,6	0,2	7,1	0,8	0,2	0,3	13,1	
	45	0,0	1,2	1,7	0,1	6,4	0,2	0,4	0,1	23,0	
	46	0,0	1,6	0,9	0,3	3,2	0,2	0,4	0,6	21,2	
	47	0,0	1,2	0,8	0,2	3,3	0,4	0,2	0,2	31,3	
	48	0,0	1,2	1,6	0,8	3,6	1,0	0,6	0,4	28,0	
49	0,0	1,1	1,4	0,5	4,0	0,6	0,4	0,9	27,7		
50	0,0	0,9	0,8	0,2	3,6	1,0	0,4	0,9	28,3		
51	0,0	0,8	1,1	0,4	3,5	1,4	1,0	0,4	28,6		
52	0,0	1,4	0,7	0,2	3,0	1,7	0,9	0,4	30,3		
53	0,0	1,3	0,8	0,4	3,7	2,3	1,0	0,8	28,6		
2021	1	0,2	1,1	0,7	0,1	2,4	0,9	0,4	0,3	31,1	
	2	0,1	1,8	1,4	0,1	2,8	2,1	1,0	0,7	28,5	
	3	0,0	2,6	1,3	0,2	2,8	2,2	1,0	0,7	24,9	
	4	0,0	2,4	1,1	0,1	3,5	2,7	1,3	0,6	26,6	
	5	0,1	1,7	1,1	0,2	5,5	3,1	1,7	1,3	21,8	
	6	0,1	1,4	1,4	0,2	5,2	3,5	3,0	0,7	19,8	
	7	0,1	1,5	1,1	0,5	5,4	4,9	2,9	1,1	15,4	
	8	0,2	1,8	1,3	0,2	5,6	5,4	3,7	1,3	17,2	
	9	0,3	2,3	1,4	0,4	5,8	4,6	4,0	1,1	17,2	

Год Year	Неделя Week	Частота детекции вирусов Frequency of virus detection									
		Грипп типа А и В Influenza type A and B	Парагрипп Parainfluenza	Аденовирус Adenovirus	РСВ RSV	Риновирус Rhinovirus	Коронавирус Coronavirus	Метатлепневмовирус Metarheumovirus	Бокавирус Bocavirus	SARS-CoV-2	
2021	10	0,1	2,3	1,2	0,4	4,4	4,7	3,5	1,1	14,8	
	11	0,0	2,5	1,1	0,5	6,6	5,7	5,6	1,2	13,7	
	12	0,0	2,0	2,0	1,1	6,0	5,0	6,4	1,1	10,0	
	13	0,0	2,5	1,5	0,5	5,7	5,3	5,2	1,7	13,3	
	14	0,0	3,7	1,8	1,0	6,7	4,8	6,1	1,9	8,7	
	15	0,0	5,0	1,6	1,1	7,6	4,1	5,1	1,6	11,7	
	16	0,0	6,5	2,8	1,1	6,4	3,8	4,2	1,4	9,6	
	17	0,0	4,5	1,6	1,1	5,3	2,1	3,1	1,1	13,4	
	18	0,0	3,8	2,1	1,2	6,5	2,4	2,2	1,0	17,7	
	19	0,0	7,5	1,7	0,4	5,8	1,5	2,3	1,2	17,0	
	20	0,0	5,8	1,1	0,8	6,7	1,6	1,3	0,9	14,2	

выявленных случаев и смертей) на фоне изменившейся картины выявленных методом ПЦР вирусов SARS-CoV-2, ОРВИ и гриппа на пике заболеваемости (превалирующий штамм омикрон) и снижения до минимальных значений на 6 и 13 неделях (12 февраля и 2 апреля 2022 г.).

Снижение числа новых случаев в 11,4 и летальных исходов в 2,1 раза вследствие COVID-19 происходило при неизменных показателях лабораторного обнаружения вируса гриппа (0,8%) и увеличении частоты выявления возбудителей других ОРВИ. Следует учесть, что на фоне снижения заболеваемости COVID-19, не последовало увеличение доли диагностированных случаев инфекций, вызванных другими патогенами, особенно гриппом (табл. 4) [5, 10, 14, 15].

В данном случае, как и на старте пандемии COVID-19 в 2020 г., потребовалось время на реализацию процесса интерференции и вытеснение конкурентов вновь пришедшим коронавирусом.

Можно предположить, что и во время предстоящего сезонного подъема заболеваемости гриппом он потеснит своих конкурентов, включая ослабленные штаммы SARS-CoV-2 на спаде заболеваемости. Загадкой является какими характеристиками контагиозности и патогенности будет обладать пришедший штамм гриппа и как изменившийся коллективный иммунитет населения страны под воздействием SARS-CoV-2 и вакцинопрофилактики отразится на клинических последствиях заболевания [5].

Интерференция между патогенами как общебиологическая категория

В прошлом исследования, посвященные феномену интерференции в микромире, оказались недооцененными, но с приходом пандемии COVID-19 интерес к ним возобновился.

Рассмотрим возможность формирования процесса интерференции на примере SARS-CoV-2. Гетеротипичная конкуренция развивалась по мере эволюции и появления новых штаммов SARS-CoV-2. Не исключается, что этот процесс оказал влияние на волнообразный подъем заболеваемости и смену клинической картины COVID-19, а также на формирование коллективного иммунитета и поддержание высокой частоты новых случаев инфицирования при смене штаммов SARS-CoV-2 [21].

Гетерологичные и гомологичные виды интерференции прослежены на конкурентных отношениях между вирусами гриппа и SARS-CoV-2, когда в течение двух лет все выделяемые опасные штаммы SARS-CoV-2 (Альфа, от 18 декабря 2020 г.; Бета, от 18 декабря 2020 г.; Гамма, от 11 января 2021 г.; Дельта, от 4 апреля 2021 г.,

Таблица 5. Уровни реализации интерференции вирусов [11, 12]

Table 5. Levels of virus interference implementation [11, 12]

Уровни реализации интерференции Levels of interference implementation	Комментарии Comments
Популяционный Population	Формирование пула ОРВИ как временного препятствия для интервенции нового вируса Formation of ARVI pool as a temporary obstacle to interfere with a new virus
Тканевой Tissue	Существование эпителиальных барьерных препятствий, включая сформированные интерфероны Existing epithelial barriers, including interferon-developed layer
Клеточный Cellular	Естественная мембранная защита клеток от суперинфекции Natural cell membrane protection from superinfection
Суперинфицирующая терапия Superinfection therapy	Использование в качестве биологического лекарства непатогенного для человека вируса Used as a biological drug in a form of a virus non-pathogenic for humans
Молекулярный внутриклеточный Molecular intracellular	<ul style="list-style-type: none"> • Мутации вирионов с формированием конкурентноспособного штамма • Образование малых интерферирующих нуклеиновых кислот (миРНК) • Формирование иных генетических механизмов, ингибирующих или потенцирующих репродукцию штаммов <ul style="list-style-type: none"> • Mutations of virions with the formation of a competitive strain • Formation of small interfering nucleic acids (siRNA) • Formation of other genetic mechanisms inhibiting or potentiating viral strain reproduction
Получение новых технологических соединений Generating new technology compounds	Действие опосредовано механизмами РНК-интерференции Mediated by RNA interference mechanisms

Омикрон, от 24 ноября 2021 г.) тормозили сезонные эпидемии гриппа и ОРВИ.

Гипотетически интерференция может реализовываться разными механизмами на нескольких уровнях биологической организации — популяционном, тканевом, клеточном и молекулярно-генетическом (табл. 5) [16].

Популяционный уровень подразумевает, что пришедший в человеческую популяцию новый патоген взаимодействует местным штаммом, ранее заселявшим определенную биологическую среду [14].

Тканевой и клеточный уровни включают исходное противодействие новому конкурирующему штамму через ранее синтезированные интерфероны, иммуноглобулины и другие гуморальные и клеточные механизмы защиты от инфекции [16].

Молекулярные механизмы реализуются внутриклеточно путем ограничения возможности репродукции новых вирионов конкурирующего патогена (табл. 5) [11, 12].

Заключение

Новые вирусы приходят в условиях заполнения всех биологических ниш представителями ранее сформированной микробиоты, что

открывает процессы конкуренции и симбиоза патогенов. Феномен интерференции был убедительно продемонстрирован на примере развития COVID-19 путем вытеснения сезонных ОРВИ и гриппа [2, 11].

Однако, картина сезонных заболеваний в 2022 г. еще сложно предсказуема, нельзя исключить приход высокопатогенных штаммов гриппа или других респираторных инфекций, что инициирует масштабное проведение вакцинальной кампании против гриппа. В случае совместной циркуляции вирусов SARS-CoV-2 и вируса гриппа в следующем сезоне возникнет потребность в активном применении быстрых диагностических тестов для обнаружения обоих возбудителей в момент обращения к медицинским работникам с целью правильного выбора тактики лечения, особенно в группах пациентов высокого риска тяжелого течения заболевания. Весьма вероятно, что после COVID-19 будут еще пандемии, вызванные другими коронавирусами, вирусами гриппа, парамиксовирусом или совершенно новым возбудителем [25, 26]. Появление новых пандемических вирусов может сопровождаться уменьшением или исчезновением циркулирующих сезонных респираторных штаммов. Процесс вытеснения ранее присутствовавших в популяции штаммов

укладывается в описанные выше механизмы интерференции [8]. COVID-19 быстро, в течение нескольких месяцев первого года пандемии внедрился в нишу, занятую другими респираторными вирусами. Ранее И.В. Киселевой и соавт. [8, 24] было высказано предположение о двух возможных сценариях развития событий: а) SARS-CoV-2 начнет вытеснять другие штаммы как более агрессивный вирус; б) виру-

сы будут сосуществовать совместно. Как показали исследования, эти две версии имеют право на существование. Учитывая неоднозначность эпидемической ситуации, не исключается возможность волнообразной интерференции патогенов, когда подавляющее воздействие SARS-CoV-2 на другие респираторные вирусы сменяется другим доминирующим патогеном по мере снижения активности коронавируса.

Список литературы/References

1. Багненко С.Ф., Беляков Н.А., Рассохин В.В., Трофимова Т.Н., Самарина А.В., Симаненков В.И., Симбирцев А.С., Ястребова Е.Б., Боева Е.В., Лукина О.В., Строкова Л.А., Бакулина Н.В., Бакулин И.Г., Ковеленов А.Ю., Тотолян А.А. Начало эпидемии COVID-19. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2020. 326 с. [Bagnenko S.F., Belyakov N.A., Rassokhin V.V., Trofimova T.N., Samarina A.V., Simanenkov V.I., Simbirtsev A.S., Yastrebova E.B., Bueva E.V., Lukina O.V., Strokoval L.A., Bakulina N.V., Bakulin I.G., Kovelenov A.Yu., Totolian A.A. The beginning of the COVID-19 epidemic. *St. Petersburg: Baltic Medical Educational Center, 2020. 326 p. (In Russ.)*]
2. Беляков Н.А., Багненко С.Ф., Рассохин В.В., Трофимова Т.Н., Колбин А.С., Лукина О.В., Симбирцев А.С., Трофимов В.И., Емельянов О.В., Кабанов М.Ю., Незнанов Н.Г., Рыбакова М.Г., Исаева Е.Р., Дидур М.Д., Тотолян А.А. Эволюция пандемии COVID-19. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2021. 410 с. [Belyakov N.A., Bagnenko S.F., Rassokhin V.V., Trofimova T.N., Kolbin A.S., Lukina O.V., Simbirtsev A.S., Trofimov V.I., Emel'yanov O.V., Kabanov M.Yu., Neznanov N.G., Rybakova M.G., Isaeva E.R., Didur M.D., Totolian A.A. The evolution of the COVID-19 pandemic. *St. Petersburg: Baltic Medical Educational Center, 2021. 410 p. (In Russ.)*]
3. Беляков Н.А., Багненко С.Ф., Трофимова Т.Н., Рассохин В.В., Незнанов Н.Г., Тотолян А.А., Лобзин Ю.В., Дидур М.Д., Лиознов Д.А., Рыбакова М.Г., Колбин А.С., Харит С.М., Климко Н.Н., Пантелеев А.М., Стома И.О., Ястребова Е.Б. Последствия пандемии COVID-19. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2022. 464 с. [Belyakov N.A., Bagnenko S.F., Trofimova T.N., Rassokhin V.V., Neznanov N.G., Totolyan A.A., Lobzin Yu.V., Didur M.D., Lioznov D.A., Rybakova M.G., Kolbin A.S., Kharit S.M., Klimko N.N., Panteleev A.M., Stoma I.O., Yastrebova E.B. Consequences of the COVID-19 pandemic. *St. Petersburg: Baltic Medical Educational Center, 2022. 464 p. (In Russ.)*]
4. Беляков Н.А., Боева Е.В., Загдын З.М., Эсауленко Е.В., Лиознов Д.А., Симакина О.Е. Эпидемиология и течение инфекционных заболеваний на фоне пандемии COVID-19. Сообщение 1. ВИЧ-инфекция, хронический гепатит С и туберкулез // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 4. С. 639–650. [Belyakov N.A., Bueva E.V., Zagdyn Z.M., Esaulenko E.V., Lioznov D.A., Simakina O.E. Epidemiology and course of infectious diseases during the COVID-19 pandemic. Report 1. HIV infection, hepatitis C and tuberculosis. *Inktsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 4, pp. 639–650. (In Russ.)* doi: 10.15789/2220-7619-EAC-1958
5. Беляков Н.А., Боева Е.В., Симакина О.Е., Светличная Ю.С., Огурцова С.В., Серебрякова С.Л., Эсауленко Е.В., Загдын З.М., Язенко А.В., Лиознов Д.А., Стома И.О. Пандемия COVID-19 и ее влияние на течение других инфекций на Северо-Западе России // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2022. Т. 14, № 1. С. 7–24. [Belyakov N.A., Bueva E.V., Simakina O.E., Svetlichnaya Yu.S., Ogurtsova S.V., Serebryakova S.L., Esaulenko E.V., Zagdyn Z.M., Yazenok A.V., Lioznov D.A., Stoma I.O. COVID-19 pandemic and its impact on other infections in Northwest Russia. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders, 2022, vol. 14, no. 1, pp. 7–24. (In Russ.)* doi: 10.22328/2077-9828-2022-14-1-7-24
6. Гипаева Г.А. Профилактика COVID-19 и ее эффективность: обзор литературы // Наука и социум: материалы Всерос. науч.-практ. конф., 2020. № XV. [Gipaeva G.A. Prevention of COVID-19 and its effectiveness: literature review. Science and Society: proceedings Materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference, 2020, No. XV. (In Russ.)] URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/profilaktika-covid-19-i-ee-effektivnost-obzor-literatury> (22.05.2022)
7. Зверев В.В., Юминова Н.В. Вакцинопрофилактика вирусных инфекций от Э. Дженнера до настоящего времени // Вопросы вирусологии. 2012. № S1. С. 33–42. [Zverev V.V., Yuminova N.V. Vaccines. Prevention of viral infections from E. Jenner to date. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2012, no. S1, pp. 33–42. (In Russ.)*]
8. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Григорьева Е.П., Ксенафонтов А.Д., Аль Фаррух М., Руденко Л.Г. Особенности циркуляции респираторных вирусов в пред- и пандемические по гриппу и COVID-19 периоды // Инфекция и иммунитет. 2021, Т. 11, № 6. С. 1009–1019. [Kiseleva I.V., Larionova N.V., Grigorieva E.P., Ksenafontov A.D., Al Farrukh M., Rudenko L.G. Salient features of circulating respiratory viruses in the pre- and pandemic influenza and COVID-19 seasons. *Inktsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1009–1019. (In Russ.)* doi: 10.15789/2220-7619-SFO-1662
9. Ларин Ф.И., Жукова Л.И., Лебедев В.В., Рафеенко Г.К. Интерферирующее взаимодействие вирусов в регуляции эпидемического процесса // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012. № 1. С. 25–29. [Larin F.I., Zhukova L.I., Lebedev V.V., Rafeyenko G.K. Interference interaction of the viruses in the regulation of an epidemic process. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases, 2012, no. 1, pp. 25–29. (In Russ.)*]
10. Михайлова Ю.В., Шальнова Е.Е. Интерференционные эффекты при проведении лабораторной диагностики на новую коронавирусную инфекцию COVID-19 // Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний. 2020. № 1 (20). С. 58–61. [Mikhailova Yu.V., Shalnova E.E. Interference effects during laboratory diagnostics for a new coronavirus infection COVID-19. *Laboratornaya diagnostika infektsionnykh zabolovaniy = Laboratory Diagnostics of Infectious Diseases, 2020, no. 1 (20), pp. 58–61. (In Russ.)*]

11. Пашков Е.А., Корчевая Е.Р., Файзулов Е.Б., Свитич О.А., Пашков Е.П., Нечаев Д.Н., Зверев В.В. Потенциал применения явления РНК-интерференции в терапии новой коронавирусной инфекции COVID-19 // Вопросы вирусологии. 2021. Т. 66, № 4. С. 241–251. [Pashkov E.A., Korchevaya E.R., Faizulov E.B., Svitich O.A., Pashkov E.P., Nechaev D.N., Zverev V.V. Potential of application of the RNA interference phenomenon in the treatment of new coronavirus infection COVID-19. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2021, vol. 66, no. 4, pp. 241–251. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-61
12. Пашков Е.А., Файзулов Е.Б., Свитич О.А., Сергеев О.В., Зверев В.В. Перспектива создания специфических противогриппозных препаратов на основе синтетических малых интерферирующих РНК // Вопросы вирусологии. 2020. № 65 (4). С. 182–190. [Pashkov E.A., Faizulov E.B., Svitich O.A., Sergeev O.V., Zverev V.V. The prospect of creating specific anti-influenza drugs based on synthetic small interfering RNAs. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2020, no. 65 (4), pp. 182–190. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-2020-65-4-182-190
13. Соломай Т.В., Семененко Т.А., Филатов Н.Н., Колбутова К.Б., Олейникова Д.Ю., Каражас Н.В. Роль детей и взрослых как резервуара возбудителей в период сезонного подъема заболеваемости инфекциями верхних дыхательных путей // Детские инфекции. 2020. № 19 (3). С. 5–11. [Solomay T.V., Semenenko T.A., Filatov N.N., Kolbutova K.B., Oleinikova D.Yu., Karazhas N.V. The role of children and adults as a reservoir of pathogens during the seasonal rise in the incidence of upper respiratory tract infections. *Detskie infektsii = Children Infections*, 2020, no. 19 (3), pp. 5–11. (In Russ.)] doi: 10.22627/2072-8107-2020-19-3-5-11
14. Соминина А.А., Даниленко Д.М., Столяров К.А., Карпова Л.С., Бакаев М.И., Леванюк Т.П., Бурцева Е.И., Лиознов Д.А. Интерференция SARS-CoV-2 с другими возбудителями респираторных вирусных инфекций в период пандемии // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2021. Т. 20, № 4. С. 28–39. [Sominina A.A., Danilenko D.M., Stolyarov K.A., Karпова L.S., Bakaev M.I., Levanyuk T.P., Burtseva E.I., Lioznov D.A. Interference of SARS-CoV-2 with other respiratory viral infections agents during pandemic. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2021, vol. 20, no. 4, pp. 28–39. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2021-20-4-28-39
15. ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева» МЗ РФ. Еженедельный национальный бюллетень по гриппу и ОРВИ за 21 неделю 2022 года (23.05.22 – 29.05.22), ситуация в России. [Smorodintsev Research Institute of Influenza: Weekly national bulletin on influenza and SARS for the 21st week of 2022 (23.05.22–29.05.22), the situation in Russia. (In Russ.)] URL: https://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics (30.05.2022)
16. Харченко Е.П. Коронавирус SARS-CoV-2: сложности патогенеза, поиски вакцин и будущие пандемии // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2020. Т. 19, № 3. С. 4–20. [Kharchenko E.P. The Coronavirus SARS-CoV-2: the complexity of infection pathogenesis, the search of vaccines and possible future pandemics. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2020, vol. 19, no. 3, pp. 4–20. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2020-19-3-4-19
17. Da Costa V.G., Saivish M.V., Santos D.E.R., de Lima Silva R.F., Morelli M.L. Comparative epidemiology between the 2009 H1N1 influenza and COVID-19 pandemics. *J. Infect. Public Health*, 2020, no. 13 (12), pp. 1797–1804. doi: 10.1016/j.jiph.2020.09.023
18. Fröhlich G.M., De Kraker M.E.A., Abbas M., Keiser O., Thiabaud A., Roelens M., Cusini A., Flury D., Schreiber P.W., Buettcher M., Corti N., Vuichard-Gysin D., Troillet N., Sauter J., Gaudenz R., Damonti L., Balmelli C., Iten A., Widmer A., Harbarth S., Sommerstein R. Hospital outcomes of community-acquired COVID-19 versus influenza: Insights from the Swiss hospital-based surveillance of influenza and COVID-19. *Euro Surveill.*, 2022, vol. 27, no. 1: 2001848. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.1.2001848
19. Groves H.E., Papenburg J., Mehta K., Bettinger J.A., Sadarangani M., Halperin S.A., Morris S.K.; for members of the Canadian Immunization Monitoring Program Active (IMPACT). The effect of the COVID-19 pandemic on influenza-related hospitalization, intensive care admission and mortality in children in Canada: a population-based study. *Lancet Reg. Health Am.*, 2022, vol. 7: 100132. doi: 10.1016/j.lana.2021.100132.
20. Han S., Zhang T., Lyu Y., Lai S., Dai P., Zheng J., Yang W., Zhou X.H., Feng L. Influenza's plummeting during the COVID-19 pandemic: the roles of mask-wearing, mobility change, and SARS-CoV-2 interference. *Engineering (Beijing)*, 2022. doi: 10.1016/j.eng.2021.12.011
21. Khaitov M.R., Laza-Stanca V., Edwards M.R., Walton R.P., Rohde G., Contoli M., Papi A., Stanciu L.A., Kotenko S.V., Johnston S.L. Respiratory virus induction of alpha-, beta- and lambda-interferons in bronchial epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells. *Allergy*, 2009, vol. 64, no. 3, pp. 375–386. doi: 10.1111/j.1398-9995.2008.01826.x
22. Lu Y., Wang Y., Shen C., Luo J., Yu W. Decreased incidence of influenza during the COVID-19 pandemic. *Int. J. Gen. Med.*, 2022, vol. 15, pp. 2957–2962. doi: 10.2147/IJGM.S343940
23. Ludwig M., Jacob J., Basedow F., Anderson F., Walker J. Clinical outcomes and characteristics of patients hospitalized for Influenza or COVID-19 in Germany. *Int. J. Infect. Dis.*, 2021, no. 103, pp. 316–322. doi: 10.1016/j.ijid.2020.11.204
24. Palese P., Wang T.T. Why do influenza virus subtypes die out? A hypothesis. *mBio*, 2011, vol. 2, no. 5: e00150-11. doi: 10.1128/mBio.00150-11
25. Petersen E., Koopmans M., Go U., Hamer D.H., Petrosillo N., Castelli F., Storgaard M., Al Khalili S., Simonsen L. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 9, pp. 238–244. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30484-9
26. Piret J., Boivin G. Viral interference between respiratory viruses. *Emerg. Infect. Dis.*, 2022, vol. 28, no. 2, pp. 273–281. doi: 10.3201/eid2802.211727
27. Piroth L., Cottenet J., Marie A.-S., Bonniaud P., Blot M., Tubert-Bitter P., Quantin C. Comparison of the characteristics, morbidity, and mortality of COVID-19 and seasonal influenza: a nationwide, population-based retrospective cohort study. *Lancet Respir. Med.*, 2021, vol. 9, no. 3, pp. 251–259. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30527-0
28. Stamm P., Sagoschen I., Wise K., Plachter B., Münzel T., Gori T., Vosseler M. Influenza and RSV incidence during COVID-19 pandemican observational study from in-hospital point-of-care testing. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2021, vol. 210, no. 5–6, pp. 277–282. doi: 10.1007/s00430-021-00720-7

29. Yeoh D.K., Foley D.A., Minnie-Smith C.A., Martin A.C., Mace A.O., Sikazwe C.T., Le H., Levy A., Blyth C.C., Moore H.C. Impact of Coronavirus Disease 2019 public health measures on detections of influenza and respiratory syncytial virus in children during the 2020 Australian winter. *Clin. Infect. Dis.*, 2021, vol. 72, no. 12, pp. 2199–2202. doi: 10.1093/cid/ciaa1475
30. Yue H., Zhang M., Xing L., Wang K., Rao X., Liu H., Tian J., Zhou P., Deng Y., Shang J. The epidemiology and clinical characteristics of co-infection of SARS-CoV-2 and influenza viruses in patients during COVID-19 outbreak. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, pp. 2870–2873. doi: 10.1002/jmv.26163

Авторы:

Боева Е.В., к.м.н., ассистент кафедры социально значимых инфекций ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; врач-инфекционист, зав. отделением хронической вирусной инфекции Северо-Западного Окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Беляков Н.А., д.м.н., профессор, академик РАН, зав. кафедрой социально значимых инфекций ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; главный научный сотрудник ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; руководитель Северо-Западного Окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Симакина О.Е., к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Даниленко Д.М., к.б.н., зам. директора по научной работе ФГБУ Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Леонов Д.А., д.м.н., зав. кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Boeva E.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Socially Significant Infections, First Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Infectious Disease Doctor, Head of Department of Chronic Viral Infection in North-West District Center for Prevention and Control of AIDS, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Belyakov N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Head of the Department of Socially Significant Infections, First Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Chief Researcher of the Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Head of North-West District Center for Prevention and Control of AIDS, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Simakina O.E., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Immunology and Virology of HIV infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Danilenko D.M., PhD (Biology), Deputy Director for Scientific Work, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Lioznov D.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, First Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.05.2022
Отправлена на доработку 28.07.2022
Принята к печати 20.08.2022

Received 25.05.2022
Revision received 28.07.2022
Accepted 20.08.2022

DISSEMINATED PURULENT PERITONITIS OUTCOME AFFECTS NKT CELL PHENOTYPE

A.A. Savchenko^a, A.G. Borisov^a, I.V. Kudryavcev^{b,c}, V.D. Belenjuk^a

^a Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center”, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Russian Ministry of Health, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. The aim of our study was to investigate the main characteristics of peripheral blood NKT cell phenotype in patients with disseminated purulent peritonitis (DPP) in dynamics of postoperative period, depending on the disease outcome. Fifty-two patients with acute surgical diseases and injuries of the abdominal organs complicated by DPP, and 68 healthy individuals in control group, were examined. Blood sampling was performed before surgery (preoperative period), as well as on the day 7, 14 and 21 of postoperative period. All patients with DPP were divided into two groups depending on disease outcome in postoperative period: patients with favorable disease outcome (n = 34); and patients with unfavorable outcome (n = 18). Study of the phenotype of blood NKT lymphocytes was performed by flow cytometry using direct immunofluorescence of whole peripheral blood samples with monoclonal antibodies. The low relative and absolute level of NKT cells was observed in DPP patients regardless of outcome disease in preoperative period. At the same time, the absolute level of NKT cells returned to normal only in patients with favorable DPP outcome and only by day 21 after surgery. Patients with favorable DPP outcome by the end of examination period had normalized quantity of mature NKT-lymphocytes and significantly decreased level of cytotoxic cells which was apparently associated with migration of such cell subsets to site of inflammation. A reduced level of non-classical (expressing CD8 marker) mature and cytokine-producing NKT cells was detected only in patients with favorable DPP outcome in preoperative period which returned to normal by the end of postoperative period. At the same time, patients with unfavorable disease outcome had reduced quantity of NKT cells of these subsets by day 21 of postoperative treatment. Patients with favorable outcome had high level of mature and cytotoxic CD11b⁺ NKT cells already in the preoperative period, while patients with unfavorable DPP outcome had increased level of cytotoxic CD11b⁺ NKT cells only by day 21 after surgery. The proportion of NKT cells expressing activation markers (CD28 and CD57) was reduced in patients in preoperative period that returned to normal immediately after surgery with favorable outcome, while it recovered with unfavorable outcome closer to the end of postoperative examination. The defined features of NKT cell phenotype in patients with unfavorable DPP outcome characterize disturbances in subset ratio and mechanisms of functioning of this cell fraction. This determines a need to develop immunotherapeutic methods aimed at stimulating immunoregulatory activity of NKT cells.

Key words: peritonitis, NKT cells, phenotype, disease outcome, postoperative period, CD3⁻CD56⁺.

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 812 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Contacts:

Igor V. Kudryavtsev
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Academician Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 812 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Для цитирования:

Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д. Особенности фенотипа NKT-клеток в зависимости от исхода распространенного гнойного перитонита // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1040–1050. doi: 10.15789/2220-7619-DPP-2004

Citation:

Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavcev I.V., Belenjuk V.D. Disseminated purulent peritonitis outcome affects NKT cell phenotype // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1040–1050. doi: 10.15789/2220-7619-DPP-2004

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА NKT-КЛЕТОК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСХОДА РАСПРОСТРАНЕННОГО ГНОЙНОГО ПЕРИТОНИТА

Савченко А.А.¹, Борисов А.Г.¹, Кудрявцев И.В.^{2,3}, Беленюк В.Д.¹

¹ ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия

² ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью исследования было изучение особенностей фенотипа NKT-клеток у больных распространенным гнойным перитонитом (РГП) в динамике послеоперационного периода в зависимости от исхода заболевания. Обследовано 52 пациента с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП, и 68 здоровых людей в качестве лиц контрольной группы. Забор крови у больных производили перед операцией (дооперационный период), а также на 7-е, 14-е и 21-е сутки послеоперационного периода. В зависимости от исхода заболевания в послеоперационном периоде, все больные РГП были разделены на две группы: больные с благоприятным исходом заболевания ($n = 34$), пациенты с неблагоприятным исходом ($n = 18$). Исследование фенотипа NKT-лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с моноклональными антителами. У обследованных пациентов с РГП независимо от исхода заболевания в дооперационном периоде понижено относительное и абсолютное содержание NKT-клеток, причем в обеих группах больных процентное количество клеток восстанавливается сразу после операции. В то же время абсолютный уровень NKT-клеток нормализуется только у больных с благоприятным исходом РГП и только к 21-м суткам после операции. К концу периода обследования у больных с благоприятным исходом РГП в периферической крови нормализуется содержание зрелых NKT-лимфоцитов и значительно снижается количество цитотоксических клеток, что, по-видимому, определяется их миграцией в зону воспаления. Только у больных с благоприятным исходом РГП пониженный уровень неклассических (экспрессирующих CD8-маркер) зрелых и цитокин-продуцирующих NKT-клеток в дооперационном периоде нормализуется до контрольных значений к концу периода послеоперационного обследования. В то же время у пациентов с неблагоприятным исходом заболевания содержание данных субпопуляций NKT-клеток к 21-м суткам послеоперационного лечения понижено. У больных с благоприятным исходом заболевания выявляется высокий уровень зрелых и цитотоксических CD11b⁺NKT-клеток уже в дооперационном периоде, тогда как при неблагоприятном исходе РГП повышенное содержание цитотоксических CD11b⁺NKT-клеток обнаружено только к 21-м суткам после операции. Содержание NKT-клеток с экспрессией активационных маркеров (CD28 и CD57), сниженное у больных в дооперационном периоде, при благоприятном исходе нормализуется сразу после операции, тогда как при неблагоприятном исходе — ближе к концу послеоперационного обследования. Установленные особенности фенотипа NKT-клеток у больных с неблагоприятным исходом РГП характеризуют нарушения в соотношении субпопуляционного состава и механизмах функционирования данной фракции клеток, что определяет необходимость разработки иммунотерапевтических методов, направленных на стимуляцию иммунорегуляторной активности NKT-клеток.

Ключевые слова: перитонит, NKT-клетки, фенотип, исход заболевания, послеоперационный период, CD3⁺CD56⁺.

Introduction

Disseminated purulent peritonitis (DPP) remains one of the unsolved problems of modern abdominal surgery due to high morbidity and mortality. The disease is a complication of a number of surgical diseases or abdominal injuries (acute appendicitis, perforated gastric and duodenal ulcer, acute gangrenous cholecystitis, pancreatic necrosis, perforation of hollow organs, their damage during trauma, etc.) in the vast majority of cases [22, 27, 28]. Mortality in DPP is about 20–30%, reaching the highest figures in the development of multiple organ failure and septic shock, the prevention and relief of which are key in the treatment of peritonitis [33, 34].

It has been proven that the course of the infectious process in the abdominal cavity, and the nature

and characteristics of the development of purulent postoperative complications, are determined not only by the severity of the underlying disease, and the adequacy of the surgical intervention performed and the completeness of the intensive care, but also by the functional state of the immune system [3, 19, 24]. Yang et al. (2022) reported that patients with spontaneous bacterial peritonitis had IL-13 overexpression in their ascites and a reduced functional activity of CD8⁺ T cells [41]. There is evidence that an increased level of macrophage mannose receptor (CD206) expression on peritoneal macrophages was associated with an increased risk of an adverse outcome of peritonitis [38]. Previously, we found that the number of “naïve” B lymphocytes and B2 cells non-expressing and expressing CD23 in patients with an unfavorable outcome of DPP was higher

than in patients with a favorable outcome of this disease [2]. Violations of the mechanisms of the respiratory burst of neutrophils as well as a decrease in their phagocytic activity, and the level of TNF α synthesis in patients with DPP, were previously identified and presented in a number of publications [5, 21].

Natural killer T cells (NKT) are defined as a heterogeneous subset of T lymphocytes with a CD3⁺CD16/56⁺ phenotype, i.e. they combine the phenotypic characteristics of T and NK cells [11, 40]. Accordingly, the functional activity of NKT cells is realized in various mechanisms of the immune response, realizing the relationship between natural resistance and adaptive immunity. This lymphocyte subset is involved in the mechanisms of antiviral and antiparasitic protection, and also secreted different immunoregulatory cytokines in the site of inflammation [1, 10, 12]. In addition, NKT cells are able to stimulate and inhibit antitumor immune responses [9, 39].

Semi-invariant $\alpha\beta$ -TCR expressed by NKT cells could recognize α -glycuronylceramides (one of the main components of gram-negative bacteria cell wall) that led to the formation of a complex of antimicrobial functions including those mediated by the induction of CD40L and pronounced stimulation of Th1 and Th2 lymphocytes [10, 16]. Therefore, NKT cells are also involved in immune-inflammatory processes development. For instance, Nilsson et al. demonstrated that NKT cell cytokine profile switching regulated liver sterile inflammation [31]. It was shown that NKT cells made a significant contribution to mucosal immunity regulation by intestinal homeostasis controlling and participating in the development of inflammatory diseases of the abdominal cavity [11].

Thus, the aim of our investigation was to study the characteristics of NKT cell phenotype in patients with DPP in the dynamics of the postoperative period in depending on the outcome of the disease.

Materials and methods

Study participants. Fifty-two patients with acute surgical diseases and injuries of the abdominal organs complicated by DPP aged 25–65 years (the mean age of the patients was 49.6 years) who were treated at the Krasnoyarsk regional purulent-septic center at the Regional Clinical Hospital were examined. Exclusion criteria from the study were the presence of acute destructive pancreatitis (pancreatic necrosis), total mesenteric thrombosis, oncological diseases and tuberculosis. The volume of surgical intervention and the number of sanations were determined by the attending physician depending on the patient's condition. Blood sampling was performed before the surgery (preoperative period) as well as on the 7th, 14th and 21st days of the postoperative period. All patients were divided into two groups depending on the outcome of peritonitis in the postoperative period: group 1 — patients with a favorable outcome

of the disease (n = 34); and group 2 — patients with an unfavorable outcome (n = 18). Sixty-eight healthy people were examined as a control group.

All studies were performed with the informed consent of the patients and in accordance with the Helsinki Declaration of the World Association “Ethical Principles of Scientific Medical Research Involving Humans” as amended in 2013 and “Rules Of Clinical Practice In The Russian Federation” approved by the Order of the Russian Ministry of Health (19.06.2003, No. 266).

Flow cytometry. Study of the phenotype of NKT cells was performed by flow cytometry using direct immunofluorescence of whole peripheral blood with monoclonal antibodies (Beckman Coulter, USA). The preparation of blood samples and the adjustment of the flow cytometer were carried out in accordance with the recommendations presented in the article by Khaidukov et al. [7]. The distribution of antibodies along the fluorescence channels was carried out in accordance with the principles of panel formation for multicolor cytofluorometric studies [4]. Immunophenotyping of cells was performed by staining 200 μ l of whole EDTA-stabilized blood with the following combination of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: anti-CD3 Alexa Fluor 700 (clone UCHT1, isotype — Mouse IgG1), anti-CD8 Allophycocyanin (clone B9.11, isotype — Mouse IgG1), anti-CD11b Phycoerythrin-Texas Red-X (clone J33, isotype — Mouse IgG1), anti-CD16 Phycoerythrin-Cyanin 7 (clone 3G8, isotype — Mouse IgG1), anti-CD28 Phycoerythrin (clone CD28.2, isotype — Mouse IgG1), anti-CD45 Alexa Fluor 750 (clone J33, isotype — Mouse IgG1), anti-CD56 Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (clone N901, isotype — Mouse IgG1), and anti-CD57 Fluorescein Isothiocyanate (clone NC1, isotype — Mouse IgM).

Incubation of blood samples with antibodies was carried out for 15 min at room temperature and in the dark. Lysis of erythrocytes was carried out for 15 min using 2 ml of VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter, Inc., USA) with the addition of 50 μ l of IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, Inc., USA). Stained cells were analyzed on a Navios flow cytometer (Beckman Coulter, Inc., USA) of the Krasnoyarsk Regional Center of Research Equipment of Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”. At least 50000 lymphocytes were analyzed for each blood sample. The obtained data were analyzed using the Kaluza software package (Beckman Coulter, Inc., USA).

Statistical analysis. The results were presented using the median (Me) and interquartile range as 25th (Q₁) and 75th (Q₃) percentiles. The significance of differences between the indicators of independent samples was assessed using the non-parametric Mann–Whitney test (Mann–Whitney U test). The significance of differences in indicators in the dynamics of treatment was determined

Table 1. Content of blood NKT cells in patients with a favorable DPP outcome in the dynamics of the postoperative period (Me, Q₁–Q₃)

Parameters	Control n = 68	Preoperative period n = 34	7 days after surgery n = 34	14 days after surgery n = 34	21 days after surgery n = 34
CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺ , %	3.51 1.98–6.90	1.90 1.19–3.29 p ₁ = 0.011	3.31 2.19–7.12	2.84 2.31–4.45	3.50 3.13–5.51
CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0.07 0.04–0.19	0.02 0.007–0.03 p ₁ = 0.007	0.03 0.02–0.04 p ₁ = 0.039	0.03 0.01–0.05 p ₁ = 0.039	0.08 0.05–0.14 p ₂ = 0.043
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	0.73 0.43–1.25	0.37 0.23–0.69 p ₁ = 0.029	0.70 0.37–1.00	0.39 0.19–0.69 p ₁ = 0.035	0.67 0.43–1.01
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁻ , %	0.87 0.56–1.06	0.85 0.60–1.80	1.15 0.92–1.55	0.70 0.51–1.25	0.39 0.28–0.49 p ₁ = 0.023 p ₂ = 0.021 p ₃ = 0.014
CD3 ⁺ CD16 ⁻ CD56 ⁺ , %	1.93 1.29–2.67	0.59 0.35–1.60 p ₁ = 0.004	1.50 0.70–2.91 p ₂ = 0.045	1.80 0.50–2.41 p ₂ = 0.048	2.29 1.93–2.90 p ₂ < 0.001

Note. p₁ — statistically significant differences versus controls; p₂ — statistically significant differences versus patients with DPP before surgery; p₃ — statistically significant differences versus 7 days after surgery patients.

by the Wilcoxon test (Wilcoxon matched pairs test). Friedman's rank analysis of variance (Friedman ANOVA by Ranks) was also used to assess changes in the studied parameters in the dynamics of postoperative treatment. Statistical analysis was carried out using the Statistica 8.0 software package (StatSoft Inc., USA, 2007).

Results

We noticed that the absolute and relative numbers of NKT cell were decreased in patients in the preoperative period with a favorable outcome of DPP if compared to healthy controls, and this was mainly due to cells with CD3⁺CD16⁺CD56⁺ and CD3⁺CD16⁻CD56⁺ phenotypes (Table 1). The absolute number

of NKT lymphocytes in patients with a favorable outcome of DPP remained reduced in compared to control values on the 7th day after surgery. An increase in CD3⁺CD16⁻CD56⁺ cells levels if compared with the initial time point was also found, and this content remained until the end of the observed period.

Moreover, the consistent increase of CD3⁺CD16⁻CD56⁺ cells frequency was also confirmed by the results of Friedman ANOVA test: $\chi^2 = 13.08$, $p = 0.004$. The absolute number of NKT cells in patients with a favorable outcome of DPP remained on the 14th day of postoperative treatment, but with a decrease in the percentage of CD3⁺CD16⁺CD56⁺ cells vs. control group. Patients with a favorable outcome of peritonitis showed a normalization of the absolute number of circulating NKT cells and a reduced percentages

Table 2. Subsets of NKT cells with CD8 expression in patients with a favorable DPP outcome in the dynamics of the postoperative period (Me, Q₁–Q₃)

Parameters	Control n = 68	Preoperative period n = 34	7 days after surgery n = 34	14 days after surgery n = 34	21 days after surgery n = 34
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	0.55 0.33–0.87	0.24 0.14–0.43 p ₁ = 0.018	0.60 0.31–0.75	0.42 0.21–0.70	0.63 0.38–1.02 p ₂ = 0.037
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁻ , %	0.18 0.12–0.22	0.05 0.03–0.11 p ₁ < 0.001	0.13 0.11–0.19	0.04 0.02–0.06 p ₁ < 0.001 p ₃ = 0.046	0.06 0.03–0.07 p ₁ < 0.001
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁻ CD56 ⁺ , %	1.60 1.14–2.22	0.60 0.36–1.25 p ₁ = 0.005	0.75 0.34–1.49 p ₁ = 0.040	1.30 0.30–1.72	1.60 1.35–2.10 p ₂ = 0.043

Note. p₁ — statistically significant differences versus controls; p₂ — statistically significant differences versus patients with DPP before surgery; p₃ — statistically significant differences versus 7 days after surgery patients.

Table 3. Content of NKT cells expressing activation and adhesion markers in patients with a favorable DPP outcome in the dynamics of the postoperative period (Me, Q₁–Q₃)

Parameters	Control n = 68	Preoperative period n = 34	7 days after surgery n = 34	14 days after surgery n = 34	21 days after surgery n = 34
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺ , %	0.012 0.003–0.041	0.043 0.017–0.074 p ₁ = 0.035	0.059 0.028–0.114 p ₁ = 0.030	0.031 0.014–0.049 p ₃ = 0.041	0.030 0.005–0.110
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁻ CD11b ⁺ , %	0.022 0.011–0.029	0.043 0.022–0.059 p ₁ = 0.047	0.059 0.040–0.310 p ₁ = 0.023	0.039 0.021–0.113	0.061 0.022–0.153 p ₁ = 0.045
CD3 ⁺ CD16 ⁻ CD56 ⁻ CD11b ⁺ , %	0.132 0.089–0.789	0.369 0.249–0.609	0.509 0.439–0.989	0.389 0.219–0.690	0.680 0.556–1.170 p ₁ = 0.041
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ CD28 ⁺ , %	1.50 0.83–3.20	0.89 0.49–1.59 p ₁ = 0.044	1.46 0.58–3.21 p ₂ = 0.047	0.90 0.60–2.70	1.00 0.54–4.43
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ CD57 ⁺ , %	1.32 0.22–2.32	0.96 0.66–1.69 p ₁ = 0.045	1.20 0.70–2.18	1.34 0.71–1.72	1.40 1.13–1.83

Note. p₁ — statistically significant differences versus controls; p₂ — statistically significant differences versus patients with DPP before surgery; p₃ — statistically significant differences versus 7 days after surgery patients.

of CD3⁺CD16⁺CD56⁻ cells if compared to control values by the end of the observed period.

We found that the level of CD8-expressing NKT cells was altered in patients with a favorable outcome of DPP (Table 2). Thus, the percentage of peripheral blood CD3⁺CD8⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD8⁺CD16⁺CD56⁻ and CD3⁺CD8⁺CD16⁻CD56⁺ cells was reduced in this group of patients even in the preoperative period if compared to healthy controls. The relative number of NKT cells with CD3⁺CD8⁺CD16⁺CD56⁺ phenotype in patients

with a favorable outcome of the disease was increased vs. control ranges on the 7th day after surgery, and it reached its maximum by the end of the observed period. The percentage of CD3⁺CD8⁺CD16⁺CD56⁻ cells in patients of this group increased if compared to control values on the 7th day after surgery, but it decreased again at 14th day point and remained at the initial level until the end of the observed period. The frequency of CD3⁺CD8⁺CD16⁻CD56⁺ NKT cells was reduced on the 7th day post-surgery, their number was increased vs. control values on the

Table 4. Content of blood NKT cells in patients with an unfavorable DPP outcome in the dynamics of the postoperative period (Me, Q₁–Q₃)

Parameters	Control n = 68	Preoperative period n = 18	7 days after surgery n = 18	14 days after surgery n = 18	21 days after surgery n = 18
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ , %	3.51 1.98–6.90	2.09 1.36–2.69 p ₁ = 0.025	3.47 1.34–5.53	3.89 0.67–5.70	2.30 1.43–4.88
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0.07 0.04–0.19	0.02 0.01–0.03 p ₁ < 0.001	0.02 0.01–0.04 p ₁ = 0.004	0.02 0.01–0.05 p ₁ = 0.021	0.03 0.01–0.06 p ₁ = 0.045
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	0.73 0.43–1.25	0.60 0.15–1.30	0.85 0.76–1.79	0.48 0.41–0.95	0.39 0.25–0.53 p ₁ = 0.043 p ₃ = 0.038
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁻ , %	0.87 0.56–1.06	0.75 0.37–1.40	1.50 1.28–3.45 p ₁ < 0.001 p ₂ = 0.029	1.37 1.00–2.15 p ₁ = 0.034	0.65 0.34–1.10
CD3 ⁺ CD16 ⁻ CD56 ⁺ , %	1.93 1.29–2.67	0.69 0.25–1.42 p ₁ = 0.010	1.19 0.93–1.32 p ₁ = 0.041	2.25 1.30–3.65 p ₂ = 0.044	1.14 0.82–1.37 p ₁ = 0.040 p ₄ = 0.047

Note. p₁ — statistically significant differences versus controls; p₂ — statistically significant differences versus patients with DPP before surgery; p₃ — statistically significant differences versus 7 days after surgery patients; p₄ — statistically significant differences versus 14 days after surgery patients.

Table 5. Subsets of NKT cells with CD8 expression in patients with an unfavorable DPP outcome in the dynamics of the postoperative period (Me, Q₁–Q₃)

Parameters	Control n = 68	Preoperative period n = 18	7 days after surgery n = 18	14 days after surgery n = 18	21 days after surgery n = 18
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	0.55 0.33–0.87	0.56 0.14–1.30	0.84 0.75–1.79 p ₁ = 0.043	0.39 0.20–0.89 p ₃ = 0.040	0.29 0.10–0.39 p ₁ = 0.040 p ₃ = 0.008
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁻ , %	0.18 0.12–0.22	0.10 0.06–0.90	0.60 0.14–1.28 p ₁ = 0.044	0.70 0.32–1.08 p ₁ < 0.001	0.13 0.05–0.49 p ₄ = 0.027
CD3 ⁺ CD8 ⁻ CD16 ⁻ CD56 ⁺ , %	1.60 1.14–2.22	0.19 0.07–0.87 p ₁ < 0.001	0.79 0.30–2.09	0.83 0.49–1.85 p ₂ = 0.047	0.64 0.19–0.71 p ₁ < 0.001

Note. p₁ — statistically significant differences versus controls; p₂ — statistically significant differences versus patients with DPP before surgery; p₃ — statistically significant differences versus 7 days after surgery patients; p₄ — statistically significant differences versus 14 days after surgery patients.

14th day of treatment, and reached its maximum by the end of the observed period. The sequence of changes in the content of NKT cells with this phenotype was also confirmed using the Friedman ANOVA test ($\chi^2 = 9.60$, $p = 0.022$).

Next, we investigated the expression of cell adhesion molecules and activation markers by peripheral blood NKT cells (Table 3). We found increased levels of CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD11b⁺ and CD3⁺CD16⁺CD56⁻CD11b⁺ NKT cells in blood samples from DPP patients with a favorable outcome in compared to controls, while the frequencies of CD28⁻ and CD57⁻ expressing NKT cells were decreased (Table 3). Moreover, CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD11b⁺ cells in patients of this group were decreased if compared to control values from the 14th day, while the number of CD3⁺CD16⁺CD56⁻CD11b⁺ cells remained elevated by end of our observed period. The number of CD3⁺CD16⁻CD56⁺CD11b⁺ NKT cells in the

current patients group increased significantly vs. healthy controls only at the end of the observation period, that was also confirmed by the Friedman ANOVA test ($\chi^2 = 12.60$, $p = 0.006$). The percentage of NKT cells expressing CD28 and CD57 increased from the beginning of postoperative treatment and remained at the control levels until the end of the examination period.

The percentage of NKT cells in the blood of patients with DPP with an unfavorable outcome of the disease was reduced vs. control levels before the surgery, while their relative number restored after the surgery (Table 4). However, the absolute number of NKT cells in patients of this group was reduced in preoperative and postoperative periods if compared to control group. The percentage of CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NKT cells in patients with an unfavorable outcome of DPP corresponded to the control values in the preoperative period and within 14 days of subsequent

Table 6. Content of NKT cells expressing activation and adhesion markers in patients with an unfavorable DPP outcome in the dynamics of the postoperative period (Me, Q₁–Q₃)

Parameters	Control n = 68	Preoperative period n = 18	7 days after surgery n = 18	14 days after surgery n = 18	21 days after surgery n = 18
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺ , %	0.012 0.003–0.041	0.033 0.006–0.174	0.017 0.006–0.029	0.045 0.019–0.095	0.006 0.004–0.029
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁻ CD11b ⁺ , %	0.022 0.011–0.029	0.017 0.006–0.104	0.007 0.003–0.008 p ₁ < 0.001	0.010 0.004–0.025	0.074 0.069–0.084 p _{1,2,3} < 0.001 p ₄ = 0.014
CD3 ⁺ CD16 ⁻ CD56 ⁺ CD11b ⁺ , %	0.132 0.089–0.789	1.079 0.623–1.205 p ₁ = 0.024	0.812 0.225–2.550 p ₁ = 0.037	0.640 0.210–1.374 p ₁ = 0.046	0.993 0.337–2.260 p ₁ = 0.018
CD3 ⁺ CD16 ^{+/56⁺} CD28 ⁺ , %	1.50 0.83–3.20	0.34 0.16–1.14 p ₁ = 0.006	0.56 0.41–1.29 p ₁ = 0.016	1.40 0.30–2.71	1.90 1.00–2.35 p ₂ = 0.045
CD3 ⁺ CD16 ^{+/56⁺} CD57 ⁺ , %	1.32 0.22–2.32	0.59 0.04–0.85 p ₁ = 0.011	0.20 0.03–1.00 p ₁ = 0.031	0.49 0.04–1.09 p ₁ = 0.038	1.00 0.20–1.11

Note. p₁ — statistically significant differences versus controls; p₂ — statistically significant differences versus patients with DPP before surgery; p₃ — statistically significant differences versus 7 days after surgery patients; p₄ — statistically significant differences versus 14 days after surgery patients.

treatment, but it decreased by the end of the observed period. The level of CD3⁺CD16⁺CD56⁻ cells in patients of this group also corresponded to the control values in the preoperative period, while it significantly increased by the 7th and 14th days of observation. Moreover, it returned to initial ranges by the 21st day of postoperative treatment. At the same time, the percentage of CD3⁺CD16⁻CD56⁺ NKT cells in patients with an unfavorable outcome of DPP was reduced in the preoperative period, but it reached the control values on the 14th day of postoperative treatment, and then decreased by the end observed period if compared to healthy controls.

The relative numbers of peripheral blood CD3⁺CD8⁺CD16⁺CD56⁺ and CD3⁺CD8⁺CD16⁻CD56⁻ cells in patients with an unfavorable outcome of DPP in the preoperative period corresponded to the control values (Table 5). The frequencies of CD3⁺CD8⁺CD16⁺CD56⁺ cells were increased by the 7th day after the surgery, but it significantly decreased by the end of the observed period if compared to controls. The level of CD3⁺CD8⁺CD16⁻CD56⁻ cells was increased if compared to control values on the 7th and 14th days of postoperative treatment, but their number decreased to the initial range by the end of the observed period. The percentage of CD3⁺CD8⁺CD16⁻CD56⁺ cells in patients with an unfavorable outcome of the disease was reduced in the preoperative period, it increased to control values on the 7th and 14th days of treatment, but, finally, it was decreased by the end of the observed period if compared to controls.

The percentage of circulating CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD11b⁺ cells in patients with an unfavorable outcome of DPP in the pre- and postoperative period corresponded to the control range, while the level of CD3⁺CD16⁻CD56⁺CD11b⁺ cells during the entire examination period exceeded the control values (Table 6). The levels of CD3⁺CD16⁺CD56⁻CD11b⁺ NKT cells in patients of this group in the preoperative period showed no differences with control values. However, the level of this cell subset decreased on the 7th day after the surgery, but then increased by the end of the observed period if compared to healthy controls and initial ranges.

The relative numbers of CD28-expressing NKT cells in patients with an unfavorable outcome of the disease were reduced compared to control values in the preoperative period and on the 7th day of the postoperative period, but they reached the control values by the end of the observed period significantly exceeding the initial level. Similarly, CD57-positive NKT cells in this group of patients were reduced in the preoperative period and during the first 14 days of postoperative treatment, but they increased to control values by the end of the observed period.

Differences in NKT cells content were found between patients with favorable and unfavorable outcomes of DPP (Tables 1, 4). Thus, the percentages

of CD3⁺CD16⁺CD56⁺ cells were increased in patients with an unfavorable outcome of the disease on the 7th day after surgery ($p = 0.045$), the level of CD3⁺CD16⁻CD56⁻ cells was increased on the 14th day ($p = 0.014$), and the relative content of CD3⁺CD16⁻CD56⁺ cells were reduced on the 21st day after surgery ($p < 0.001$) if compared to patients with a favorable outcome of DPP. Additionally, the frequencies of circulating CD3⁺CD8⁺CD16⁺CD56⁺ cells were increased in the case of an unfavorable outcome of DPP during the preoperative period ($p = 0.025$), and the level of CD3⁺CD8⁺CD16⁻CD56⁺ NKT cells was reduced if compared ($p = 0.043$) to patients with a favorable outcome of the disease (Tables 2, 5).

At the same time, an increased level of CD3⁺CD8⁺CD16⁺CD56⁺ cells in patients with an unfavorable outcome persisted on the 7th day after surgery ($p = 0.048$), while a decrease in this NKT cell subset ($p = 0.008$) was observed at 21st day of postoperative treatment if compared to patients with a favorable outcome of DPP. The percentage of CD3⁺CD8⁺CD16⁻CD56⁺ cells in patients with an unfavorable outcome also remained lower at the end of the observed period vs. patients with a favorable outcome of DPP ($p < 0.001$). The relative numbers of CD3⁺CD8⁺CD16⁺CD56⁻ cells in the blood of patients with an unfavorable outcome of DPP on the 7th and 14th days after surgery were also increased ($p = 0.017$ and $p < 0.001$, respectively).

Finally, the percentages of CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD11b⁺ cells in patients with an unfavorable outcome of DPP on the 7th and 21st days of postoperative treatment were reduced vs. patients with a favorable outcome ($p = 0.003$ and $p = 0.044$, respectively) (Tables 3, 6). Similarly, the levels of CD3⁺CD16⁻CD56⁻CD11b⁺ NKT cells were reduced on the 7th and 14th days of postoperative treatment vs. patients with an unfavorable outcome ($p < 0.001$ and $p = 0.002$, respectively). An increase in relative numbers of CD3⁺CD16⁻CD56⁺CD11b⁺ cells in patients with an unfavorable outcome vs. patients with a favorable outcome were observed only in the preoperative period ($p = 0.002$). In addition, CD28⁺ NKT cells were reduced in patients with an unfavorable outcome of DPP in the preoperative period and on the 7th day after surgery ($p = 0.020$ and $p = 0.028$, respectively), and the numbers of CD57⁺ NKT cells were reduced during the entire observation period ($p = 0.043$, $p = 0.007$, $p = 0.046$ and $p = 0.039$, respectively) relative to the indicators found in patients with a favorable course of this infectious and inflammatory disease.

Discussion

The functional activity of NKT cells is realized through effector (perforin/granzyme and/or FasL-mediated) mechanisms and regulatory (cytokine production) providing the relationship between innate and adaptive immunity [6, 12, 40]. The subset

composition of NKT cells is determined by CD16 and CD56 receptor expression. The CD16 is a low affinity immunoglobulin G receptor (FcγRIII) that is non-covalently bound to the CD3ζ molecule on the NKT cell membrane [17, 18]. CD56 (NCAM, Leu-19, NKH-1) is an immunoglobulin superfamily adhesion molecule that takes part in intercellular interaction [8, 23]. Mature NKT cells express both markers. Cells that exhibit CD16⁺CD56⁻ phenotype are defined as cytotoxic cells, while NKT cells with CD16⁻CD56⁺ phenotype are defined as cytokine-producing cells [15, 35].

In general, the relative and absolute numbers of NKT cells in the peripheral blood of patients with DPP were reduced in the preoperative period, regardless of the outcome of the disease. Moreover, if their percentage was restored already on the 7th day after the surgery then the reduced absolute level of this fraction of lymphocytes remained in the postoperative period. Only patients with a favorable outcome of the disease by the end of the observed period (on the 21st day after surgery) had increased percentages of NKT cells similar to control ranges. A feature of the dynamics of the number of NKT cells in the blood in patients with a favorable outcome of DPP was that the reduced level of cells was associated with a low content of mature and cytokine-producing NKT cells in the preoperative period, while their number was restored to control values by the end of the observed period and the number of cytotoxic NKT cells decreased. Patients with an unfavorable outcome of DPP in the preoperative period had a low level of NKT cells which was determined by a reduced content of cytokine-producing cells. The low level of cytokine-producing and mature NKT cells was also observed in patients of this group on the 21st day of postoperative treatment.

NKT cells expressing the CD8 marker are part of type II NKT cells (non-classical, non-invariant) [1, 32]. This cell fraction recognizes a wider range of antigenic molecules (compared to type I NKT cells), synthesizes cytokines that induce differentiation of Th1- and Th2-lymphocytes but also implement immunosuppressive functions [1, 14, 36]. In particular, type II NKT cells can stimulate the functional activity of myeloid suppressor cells, able to kill antigen-presenting dendritic cells and to inhibit the functional activity of cytotoxic CD8⁺ T cells through the induction of TGF-β expression [29, 30].

The content of mature, cytotoxic and cytokine-producing fractions of NKT cells with CD8 expression was reduced in the blood of patients with DPP with a favorable outcome of the disease in the preoperative period compared with control values. However, the level of mature and cytokine-producing CD8⁺NKT cells recovered to the control range by the end of the observed period (on the 21st day after the surgery). At the same time, a decrease in the content of only cytokine-producing CD8⁺ NKT cells was

found in the examined patients with an unfavorable outcome of DPP in the preoperative period relative to the control range and values detected with a favorable outcome; the level of mature CD8⁺ NKT cells even exceeded that detected in case of a favorable outcome of the disease. However, the number of all studied fractions of CD8⁺NKT cells was significantly reduced compared to control values by the 21st day of postoperative treatment.

The CD11b receptor is a type I glycoprotein defined as a subunit of the αM integrin and forms the Mac-1 integrin in complex with the CD18 molecule (CD11b/CD18) [25, 26]. Expression of this marker on the membrane of NKT cells increases the level of effector and migratory activity. An increased numbers of CD11b-expressing mature NKT cells were found in patients with a favorable outcome of DPP in the preoperative period, their content returned to normal by day 21, while the content of CD11b⁺ cytotoxic NKT cells in the pre- and postoperative period remained elevated. In addition, the level of cytokine-producing CD11b⁺ NKT cells in individuals of this group increased towards the end of the observed period. The patients with an unfavorable outcome of the disease had a lower content of mature CD11b⁺ NKT cells by the 21st day of the postoperative period compared with the control values and the level of these cells with a favorable outcome of peritonitis. In addition, the content of cytotoxic NKT cells significantly increased in patients with an unfavorable outcome only at the end of the observed period, while the level of cytokine-producing CD11b⁺ NKT cells was increased throughout the entire period of the study.

Also, the content of NKT cells expressing activation markers CD28 and CD57 was studied in patients with DPP in depending on the outcome of the disease. The CD28 antigen (Tp44) belongs to the immunoglobulin superfamily and is involved in the enhancement of T-cell receptor signals, which determines its role in the regulation of adaptive immunity [13, 20]. Blockade of CD28 on the membrane of NKT cells completely suppressed cytokine production [37]. CD57 receptor (Leu-7, HNK-1, NK-1) was defined as an oligosaccharide with sulfated glucuronic acid residues which is expressed on membrane proteins, lipids, and proteoglycans, and its expression level is associated with the accumulation of perforin and granzyme B in the cytolytic killer granules cells [14, 32].

The frequencies of CD28⁺ and CD57⁺ NKT cells in the preoperative period was reduced relative to the control values in patients with a favorable outcome of DPP in the preoperative period. However, their number returned to normal immediately after the surgery and remained at the level of the control range until the end of the observed period. At the same time, patients with an unfavorable outcome of peritonitis had low levels of CD28⁺ and CD57⁺ NKT cells in the preoperative period which increased to control values only by the end of the observed period.

In general, it can be concluded that the systemic inflammatory response in DPP patients with an unfavorable outcome of the disease in the postoperative period was characterized by a violation of the ratio of the subset composition of NKT cells with a low level of non-classical NKT cells by the end of the observed period (day 21 after surgery) and a pronounced change in the cell content expressing adhesion and activation markers.

Conclusion

Thus, significant differences in the phenotype of peripheral blood NKT cells were found between patients with different outcome of DPP. The low relative and absolute levels of NKT cells were observed all patients with DPP regardless of the disease outcome in the preoperative period. At the same time, the absolute level of NKT cells returned to normal values only in patients with a favorable outcome of DPP post 21 days after the surgery. The content of mature NKT lymphocytes was normalized in the peripheral blood of patients with a favorable outcome of DPP by the end of the examination period. The number of cytotoxic cells in the blood of these patients significantly decreased by the 21st day of the examination which is apparently determined by their migration to the area of inflammation. At the same time, patients of this group had the level of cytokine-producing cells at the level of the control range during the entire postoperative period.

Conversely, the level of mature and cytokine-producing NKT cells was reduced in the blood of patients with an unfavorable outcome of DPP by the 21st day of the postoperative period. A reduced level of non-classical (expressing the CD8 marker) mature and

cytokine-producing NKT cells was detected only in patients with a favorable outcome of DPP in the preoperative period which returned to normal by the end of the postoperative period. At the same time, patients with an unfavorable outcome of the disease had a reduced number of NKT cells of these subsets by the 21st day of postoperative treatment. It can be assumed that a high level of systemic inflammatory response in the postoperative period in patients of this category was associated with a lack of regulatory processes in the immune system including a low level of non-classical NKT cells.

In addition, it was found that a high level of NKT cells (compared to control values) expressing the CD11b receptor was observed in patients with DPP during the entire period of the study. However, only patients with a favorable outcome of the disease had a high level of mature and cytotoxic CD11b⁺ NKT cells already in the preoperative period, while an increased content of cytotoxic CD11b⁺ NKT cells was found in patients with an unfavorable outcome of peritonitis only by the 21st day after surgery. The content of NKT cells expressing activation markers (CD28, CD57) was reduced in patients in the preoperative period; it returned to normal with a favorable outcome immediately after surgery while patients with an unfavorable outcome had a recovery of these cell fractions towards the end of the postoperative examination. The established features of the phenotype of NKT cells in patients with an unfavorable outcome of DPP characterize disturbances in the ratio of the subset composition and the mechanisms of functioning of this cell fraction. This determines the need to develop immunotherapeutic methods aimed at stimulating the immunoregulatory activity of NKT cells.

References

1. Акинфиева О.В., Бубнова Л.Н., Бессмельцев С.С. NKT-клетки: характерные свойства и функциональная значимость для регуляции иммунного ответа // Онкогематология. 2010. № 4. С. 39–47. [Akinfieva O.V., Bubnova L.N., Bessmeltsev S.S. NKT cells: characteristic properties and functional significance for the regulation of the immune response. *Onkogematologiya = Oncohematology*, 2010, no. 4, pp. 39–47. (In Russ.)]
2. Беленюк В.Д., Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В. Особенности фенотипа В-лимфоцитов крови в зависимости от исхода распространенного гнойного перитонита // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 454–462. [Belenjuk V.D., Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V. Features of peripheral blood B-cell subset phenotype are associated with clinical outcome of widespread purulent peritonitis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 454–462. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-CBC-1397
3. Борисов Р.Н., Здзитовецкий Д.Э., Каспаров Э.В., Савченко А.А., Борисов С.А., Бердников Д.С., Говоруха Е.С., Болдырев П.Н. Типы реакции иммунной системы и их характеристика у больных распространенным гнойным перитонитом // Сибирское медицинское обозрение. 2019. № 5. С. 80–87. [Borisov R.N., Zdzitovetskii D.E., Kasparov E.V., Savchenko A.A., Borisov S.A., Berdnikov D.S., Govorukha E.S., Boldyrev P.N. Types of immune system reactions and their characteristic in patients with generalized purulent peritonitis. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2019, no. 5, pp. 80–87 (In Russ.)] doi: 10.20333/2500136-2019-5-80-87
4. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 1. С. 19–26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Experience in measuring the parameters of the immune status using six-color cytofluorimetric analysis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 19–26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26
5. Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В. Особенности фенотипа и активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у больных распространенным гнойным перитонитом в прогнозе развития сепсиса // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 369–376. [Savchenko A.A.,

- Borisov A.G., Cherdancev D.V., Pervova O.V., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V. Features of the phenotype and NAD(P)-dependent dehydrogenases activity in neutrophil by patients with widespread purulent peritonitis in prognosis for sepsis development. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 369–376. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-369-376
6. Табаков Д.В., Заботина Т.Н., Борунова А.А., Панчук И.О., Короткова О.В., Кадагидзе З.Г. Гетерогенность популяций НК и NKT-лимфоцитов у здоровых доноров // Медицинская иммунология. 2017. Т. 19, № 4. С. 401–408. [Tabakov D.V., Zabolina T.N., Borunova A.A., Panchuk I.O., Korotkova O.V., Kadagidze Z.G. Heterogeneity of NK and NKT lymphocyte populations in healthy donors. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, vol. 19, no. 4, pp. 401–408. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-401-408
 7. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 3. С. 255–268. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology «Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers» (Draft). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 3, pp. 255–268. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268
 8. Almeida J.S., Couceiro P., López-Sejas N., Alves V., Růžičková L., Tarazona R., Solana R., Freitas-Tavares P., Santos-Rosa M., Rodrigues-Santos P. NKT-like (CD3⁺CD56⁺) cells in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 10, pp. 2493. doi: 10.3389/fimmu.2019.02493
 9. Bae E.A., Seo H., Kim I.K., Jeon I., Kang C.Y. Roles of NKT cells in cancer immunotherapy. *Arch. Pharm. Res.*, 2019, vol. 42, no. 7, pp. 543–548. doi: 10.1007/s12272-019-01139-8
 10. Bendelac A., Savage P.B., Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, vol. 25, pp. 297–336. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711
 11. Brailey P.M., Lebrusant-Fernandez M., Barral P. NKT cells and the regulation of intestinal immunity: a two-way street. *FEBS J.*, 2020, vol. 287, no. 9, pp. 1686–1699. doi: 10.1111/febs.15238
 12. Cairo C., Webb T.J. Effective barriers: the role of NKT cells and innate lymphoid cells in the gut. *J. Immunol.*, 2022, vol. 208, no. 2, pp. 235–246. doi: 10.4049/jimmunol.2100799
 13. Ceeraz S., Thompson C.R., Beatson R., Choy E.H. Harnessing CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells as a tool to treat autoimmune disease. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 11, pp. 2973. doi: 10.3390/cells10112973
 14. Chen Y., Tian Z. Innate lymphocytes: pathogenesis and therapeutic targets of liver diseases and cancer. *Cell. Mol. Immunol.*, 2021, vol. 18, no. 1, pp. 57–72. doi: 10.1038/s41423-020-00561-z
 15. Cichoż-Lach H., Grywalska E., Michalak A., Kowalik A., Mielnik M., Roliński J. Deviations in peripheral blood cell populations are associated with the stage of primary biliary cholangitis and presence of itching. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2018, vol. 66, no. 6, pp. 443–452. doi: 10.1007/s00005-018-0515-9
 16. De Andrés C., Fernández-Paredes L., Tejera-Alhambra M., Alonso B., Ramos-Medina R., Sánchez-Ramón S. Activation of blood CD3⁺CD56⁺CD8⁺ T cells during pregnancy and multiple sclerosis. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8, pp. 196. doi: 10.3389/fimmu.2017.00196
 17. Farrington L.A., Callaway P.C., Vance H.M., Baskevitch K., Lutz E., Warriar L., McIntyre T.I., Budker R., Jagannathan P., Nankya F., Musunguzi K., Nalubega M., Sikyomu E., Naluwu K., Arinaitwe E., Dorsey G., Kanya M.R., Feeney M.E. Oponized antigen activates Vδ2⁺ T cells via CD16/FCγRIIIa in individuals with chronic malaria exposure. *PLoS Pathog.*, 2020, vol. 16, no. 10: e1008997. doi: 10.1371/journal.ppat.1008997
 18. Ferrari L., Martelli P., Saleri R., De Angelis E., Ferrarini G., Cavalli V., Passeri B., Bazzoli G., Ogno G., Magliani W., Borghetti P. An engineered anti-idiotypic antibody-derived killer peptide (KP) early activates swine inflammatory monocytes, CD3⁺CD16⁺ natural killer T cells and CD4⁺CD8α⁺ double positive CD8β⁺ cytotoxic T lymphocytes associated with TNF-α and IFN-γ secretion. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2020, vol. 72, pp. 101523. doi: 10.1016/j.cimid.2020.101523
 19. Gao Y.L., Yao Y., Zhang X., Chen F., Meng X.L., Chen X.S., Wang C.L., Liu Y.C., Tian X., Shou S.T., Chai Y.F. Regulatory T cells: angels or demons in the pathophysiology of sepsis? *Front. Immunol.*, 2022, vol. 13, pp. 829210. doi: 10.3389/fimmu.2022.829210
 20. González-Osuna L., Sierra-Cristancho A., Cafferata E.A., Melgar-Rodríguez S., Rojas C., Carvajal P., Cortez C., Vernal R. Senescent CD4⁺CD28⁻ T lymphocytes as a potential driver of Th17/Treg imbalance and alveolar bone resorption during periodontitis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 5, pp. 2543. doi: 10.3390/ijms23052543
 21. Goswami M., Sharma D., Khan N.M., Checker R., Sandur S.K., Jawali N. Antioxidant supplementation enhances bacterial peritonitis in mice by inhibiting phagocytosis. *J. Med. Microbiol.*, 2014, vol. 63, pt 3, pp. 355–366. doi: 10.1099/jmm.0.067173-0
 22. Hu J., Yi B., Zhang H. Influence of climatic factors on single-center peritoneal dialysis-associated peritonitis. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2022, vol. 47, no. 5, pp. 639–649. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2022.210506
 23. Huang H., Liu Y., Ouyang X., Wang H., Zhang Y. Identification of a peptide targeting CD56. *Immunobiology*, 2020, vol. 225, no. 4: 151982. doi: 10.1016/j.imbio.2020.151982
 24. Ibidapo-Obe O., Stengel S., Köse-Vogel N., Quicker S., Reuken P.A., Busch M., Bauer M., Stallmach A., Bruns T. Mucosal-associated invariant T cells redistribute to the peritoneal cavity during spontaneous bacterial peritonitis and contribute to peritoneal inflammation. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 2020, vol. 9, no. 4, pp. 661–677. doi: 10.1016/j.jcmgh.2020.01.003
 25. Kabanov D.S., Grachev S.V., Prokhorenko I.R. Monoclonal antibody to CD14, TLR4, or CD11b: impact of epitope and isotype specificity on ROS generation by human granulocytes and monocytes. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2020, vol. 2020: 5708692. doi: 10.1155/2020/5708692
 26. Khan S.Q., Khan I., Gupta V. CD11b activity modulates pathogenesis of lupus nephritis. *Front. Med. (Lausanne)*, 2018, vol. 5: 52. doi: 10.3389/fmed.2018.00052
 27. Kumar V.V., Verma A., Thakur D.S., Somashekar U., Kothari R., Sharma D. Prophylactic mesh placement in emergency midline laparotomy for intestinal perforation peritonitis: an appeal for caution. *Trop. Doct.*, 2022, vol. 23: e494755221110831. doi: 10.1177/00494755221110831

28. Lotte R., Courdurié A., Gaudart A., Emery A., Chevalier A., Tran A., Payen M., Ruimy R. Spontaneous bacterial peritonitis: the incremental value of a fast and direct bacterial identification from ascitic fluids inoculated in blood culture bottles by MALDI-TOF MS for a better management of patients. *Microorganisms*, 2022, vol. 10, no. 6: 1188. doi: 10.3390/microorganisms10061188
29. Lu Y., Li Y., Zhou W., Ding B., Yu Q. Regulatory T cells regulate the distribution of natural killer T cells through CD39 signal transduction in asthma. *Hum. Cell.*, 2019, vol. 32, no. 2, pp. 141–149. doi: 10.1007/s13577-018-00226-0
30. Ngiow S.F., Young A. Re-education of the tumor microenvironment with targeted therapies and immunotherapies. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11: 1633. doi: 10.3389/fimmu.2020.01633
31. Nilsson J., Hörnberg M., Schmidt-Christensen A., Linde K., Nilsson M., Carlus M., Erttmann S.F., Mayans S., Holmberg D. NKT cells promote both type 1 and type 2 inflammatory responses in a mouse model of liver fibrosis. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, no. 1: 21778. doi: 10.1038/s41598-020-78688-2
32. Noma H., Eshima K., Satoh M., Iwabuchi K. Differential dependence on nuclear factor- κ B-inducing kinase among natural killer T-cell subsets in their development. *Immunology*, 2015, vol. 146, no. 1, pp. 89–99. doi: 10.1111/imm.12484
33. Pinson J., Tuech J.J., Ouassii M., Mathonnet M., Mauvais F., Houivet E., Lacroix E., Rondeaux J., Sabbagh C., Bridoux V. Role of protective stoma after primary anastomosis for generalized peritonitis due to perforated diverticulitis-DIVERTI 2 (a prospective multicenter randomized trial): rationale and design (nct04604730). *BMC Surg.*, 2022, vol. 22, no. 1: 191. doi: 10.1186/s12893-022-01589-w
34. Rajabaleyan P., Michelsen J., Tange Holst U., Möller S., Toft P., Luxhøj J., Buyukuslu M., Böhm A.M., Borly L., Sandblom G., Kobborg M., Aagaard Poulsen K., Schou Løve U., Ovesen S., Grant Sølling C., Mørch Søndergaard B., Lund Lomholt M., Ritz Møller D., Qvist N., Bremholm Ellebæk M.; VACOR study group. Vacuum-assisted closure versus on-demand relaparotomy in patients with secondary peritonitis—the VACOR trial: protocol for a randomised controlled trial. *World J. Emerg. Surg.*, 2022, vol. 17, no. 1: 25. doi: 10.1186/s13017-022-00427-x
35. Senpuku H., Miyazaki H., Yoshihara A., Yoneda S., Narisawa N., Kawarai T., Nakagawa N., Miyachi M., Tada A., Yoshida G., Shimada M., Ohashi M., Nishimuta M., Kimura Y., Yoshitake Y. CD56(dim)CD16(high) and CD56(bright)CD16(–) cell percentages associated with maximum knee extensor strength and incidence of death in elderly. *Springerplus*, 2016, vol. 5: 244. doi: 10.1186/s40064-016-1884-3
36. Shen H., Gu C., Liang T., Liu H., Guo F., Liu X. Unveiling the heterogeneity of NKT cells in the liver through single cell RNA sequencing. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, no. 1: 19453. doi: 10.1038/s41598-020-76659-1
37. Shissler S.C., Singh N.J., Webb T.J. Thymic resident NKT cell subsets show differential requirements for CD28 co-stimulation during antigenic activation. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, no. 1: 8218. doi: 10.1038/s41598-020-65129-3
38. Stengel S., Quickert S., Lutz P., Ibidapo-Obe O., Steube A., Köse-Vogel N., Yarbakht M., Reuken P.A., Busch M., Brandt A., Bergheim I., Deshmukh S.D., Stallmach A., Bruns T. Peritoneal level of CD206 associates with mortality and an inflammatory macrophage phenotype in patients with decompensated cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology*, 2020, vol. 158, no. 6, pp. 1745–1761. doi: 10.1053/j.gastro.2020.01.029
39. Terabe M., Berzofsky J.A. Tissue-specific roles of NKT cells in tumor immunity. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 1838. doi: 10.3389/fimmu.2018.01838
40. Vogt S., Mattner J. NKT cells contribute to the control of microbial infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2021, vol. 11: 718350. doi: 10.3389/fcimb.2021.718350
41. Yang L., Liu S., Zhang Q., Jia S., Qiu C., Jin Z. Overexpression of ascitic interleukin-35 induces CD8⁺ T cell exhaustion in liver cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Int. Immunopharmacol.*, 2022, vol. 108: 108729. doi: 10.1016/j.intimp.2022.108729

Авторы:

Савченко А.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;
Борисов А.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;
Кудрявцев И.В., к.б.н., зав. лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;
Беленюк В.Д., младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Cellular-Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;
Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Cellular-Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;
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;
Belenjuk V.D., Junior Researcher, Laboratory of Cellular-Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation.

КЛЕТОЧНЫЙ И ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ВЕКТОРНОЙ ВАКЦИНЫ ГАМ-КОВИД-ВАК

Е.В. Инвиева¹, В.В. Вторушина¹, Ю.С. Драпкина¹, Л.В. Кречетова¹,
Н.В. Долгушина¹, С.В. Хайдуков²

¹ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУН Институт биорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской
академии наук, Москва, Россия

Резюме. В настоящее время по мере развития пандемии SARS-CoV-2 все больше внимания уделяется созданию естественного и индуцированного вакциной иммунитета против SARS-CoV-2 и вызываемого им заболевания COVID-19. Широко распространенная профилактическая вакцинация играет важную роль в эффективной защите людей от вирусных инфекций и может снизить экономические затраты государства. Целью данного исследования было изучение субпопуляционного состава периферической крови и выраженности гуморального ответа у вакцинированных комбинированной векторной вакциной Гам-КОВИД-Вак. *Материалы и методы.* В проспективное исследование были включены 352 пациента, из которых 194 (119 женщин и 75 мужчин) проведено исследование иммунограммы и определение уровня антител к SARS-CoV-2. У пациентов исследование субпопуляционного состава лимфоцитов и определения антител к SARS-CoV-2 было проведено дважды — до вакцинации и через 90 дней после введения 1-го компонента вакцины Гам-КОВИД-Вак. В целом вакцинация переносилась пациентами хорошо, не было отмечено серьезных побочных проявлений после иммунизации. Реакция на введение вакцины (лихорадка, недомогание, головная боль, местные реакции) чаще отмечалась после введения 2-го компонента и была кратковременной (1–2 дня). *Результаты.* При сравнительном анализе показателей иммунограммы у женщин до и после вакцинации было отмечено увеличение относительного содержания Т-лимфоцитов (CD3⁺), субпопуляции Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), повышение абсолютного и относительного содержания активированных Т-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD25⁺, снижение абсолютного и относительного содержания субпопуляций естественных киллеров (CD3⁺CD56⁺CD16⁺), естественных киллерных Т-клеток (CD3⁺CD56⁺CD16⁺), а также снижение экспрессии рецептора CD147 на Т-лимфоцитах. Сходные закономерности выявлены и при исследовании иммунограммы у мужчин, за исключением увеличения содержания лимфоцитов и снижения экспрессии рецептора CD147 как на Т-, так и на В-лимфоцитах. Изменений в показателях Т-клеточного звена иммунитета выявлено не было. Высокая эффективность вакцины подтверждалась образованием специфических противовирусных антител класса G к SARS-CoV-2 у 97,5%

Адрес для переписки:

Инвиева Евгения Владимировна
117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, 4,
ФГБУ НИИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России.
Тел.: 8 (495) 438-11-83.
E-mail: e_inviyeva@oparina4.ru

Contacts:

Evgeniya V. Inviyeva
117997, Russian Federation, Moscow, Academician Oparina str., 4,
National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology
and Perinatology.
Phone: +7 (495) 438-11-83.
E-mail: e_inviyeva@oparina4.ru

Для цитирования:

Инвиева Е.В., Вторушина В.В., Драпкина Ю.С., Кречетова Л.В.,
Долгушина Н.В., Хайдуков С.В. Клеточный и гуморальный иммунный
ответ после введения комбинированной векторной вакцины
ГамКовидВак // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1051–1060.
doi: 10.15789/2220-7619-PCV-1975

Citation:

Inviyeva E.V., Vtorushina V.V., Drapkina J.S., Krechetova L.V.,
Dolgushina N.V., Khaidukov S.V. Post-Gam-Covid-Vac combined vector
vaccine cellular and humoral immune response // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6,
pp. 1051–1060. doi: 10.15789/2220-7619-PCV-1975

Работа выполнена в рамках прикладного научного исследования № АААА-А20–120111790057-6.

This work was performed as part of Applied Research No. АААА-А20-120111790057-6.

вакцинированных женщин и у 92,3% вакцинированных мужчин. *Выводы.* Полученные данные свидетельствуют, во-первых, о том, что вакцинация индуцирует специфический гуморальный иммунный ответ, который определяется через три месяца после вакцинации, а во-вторых, не приводит к серьезным нарушениям в функционировании иммунной системы, которые могли бы найти отражение в субпопуляционном составе лимфоцитов. Таким образом, из представленных данных можно сделать вывод об эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак.

Ключевые слова: вакцинация, иммунный ответ, антитела, SARS-CoV-2, COVID-19, Гам-КОВИД-Вак.

POST-GAM-COVID-VAC COMBINED VECTOR VACCINE CELLULAR AND HUMORAL IMMUNE RESPONSE

Inviyaeva E.V.^a, Vtorushina V.V.^a, Drapkina J.S.^a, Krechetova L.V.^a, Dolgushina N.V.^a, Khaidukov S.V.^b

^a National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^b Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Abstract. Currently, as the SARS-CoV-2 pandemic evolves, there has been increasingly more attention paid to building natural and vaccine-induced immunity against SARS-CoV-2 and related disease known as COVID-19. Widespread preventive vaccination plays an important role in effectively protecting people from viral infections and can reduce national economic costs. Purpose — to study peripheral blood cell subset composition and magnitude of humoral response in vaccinated Gam-COVID-Vac subjects. The prospective study included 352 patients, of which 194 (119 women and 75 men) underwent an immunogram study and assessed level of anti-SARS-CoV-2 antibodies. In patients, the study of the lymphocyte subset composition and estimation of anti-SARS-CoV-2 antibodies was carried out at two time points — prior to vaccination and 90 days after inoculated component 1 of the Gam-COVID-Vac vaccine. In general, vaccination was well tolerated by patients, with no serious adverse events after immunization. The reaction to the vaccine (fever, malaise, headache, local reactions) was short-term (1–2 days) and more often noted after inoculated vaccine component 2. Comparatively analyzed immunogram parameters in females before and after vaccination revealed increased relative level of T-lymphocytes (CD3⁺), T-helper cell subset (CD3⁺CD4⁺), increased absolute and relative level of activated CD3⁺CD25⁺ T-lymphocytes, but decreased absolute and relative level of natural killer (CD3⁻CD56⁺CD16⁺) and natural killer T-cell (CD3⁺CD56⁺CD16⁺) cell subsets as well as decreased CD147 receptor expression on T-lymphocytes. Similar patterns were also found while examining the immunogram in males excepting increased level of lymphocytes and lowered CD147 expression on both T- and B-lymphocytes. No changes in the parameters of the immune T-cell arm was found. The high efficacy of the vaccine was confirmed by development of SARS-CoV-2-specific class G antiviral antibodies in 97.5% and 92.3% of vaccinated females and males, respectively. The data obtained evidence that: 1) vaccination induces a specific humoral immune response determined three months post-vaccination, and 2) it caused no serious disturbances in the immune system functioning, which could be reflected in the peripheral blood lymphocyte subset composition. Thus, the data presented allow to conclude that Gam-COVID-Vac is effective vaccine against SARS-CoV-2 infection.

Key words: vaccination, immune response, antibodies, SARS-CoV-2, COVID-19, Gam-COVID-Vac.

Введение

Коронавирусы впервые были обнаружены в 1960-х годах [18] и названы в честь короннообразной структуры шиповидных белков на их поверхности. Согласно имеющимся данным, все коронавирусы человека имеют животное происхождение [4] и могут вызывать целый ряд заболеваний — от легких форм ОРВИ до тяжелого острого респираторного синдрома. Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) и коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), возникшие в 2002 и 2012 гг. соответственно [7], более заразны и опасны как для детей, пожилых людей, так и пациентов с ослабленным иммунитетом. SARS-CoV-2 был идентифицирован как бета-коронавирус с близким ге-

нетическим сходством с SARS-CoV [21]. SARS-CoV-2 менее смертоносен, чем SARS-CoV, но передается гораздо легче и быстрее [16], а длительный инкубационный период и отсутствие симптомов или их умеренное проявление затрудняют диагностику, лечение и прогноз заболевания [13]. Известно, что инкубационный период после первого контакта с SARS-CoV-2 составляет от 2 до 14 дней и, вероятно, зависит от возраста, а также от наличия сопутствующих заболеваний [17]. Подобно SARS-CoV и MERS-CoV, SARS-CoV-2 преимущественно поражает дыхательные пути, вызывая симптомы и заболевания от легких респираторных инфекций до тяжелого острого респираторного синдрома, который может приводить к полиорганной недостаточности у ряда пациентов и, в конечном итоге, к смерти [16]. Наиболее распространен-

ными симптомами COVID-19 являются лихорадка, сухой кашель, утомляемость и одышка, а тяжелые формы сопровождаются пневмонией и синдромом системного воспалительного ответа (ССВО) [11].

В настоящее время по мере развития пандемии SARS-CoV-2 все больше внимания уделяется созданию естественного и индуцированного вакциной иммунитета против SARS-CoV-2 и вызываемого им заболевания COVID-19. Вакцины от SARS-CoV-2 показали свою эффективность, особенно в предотвращении тяжелых форм заболеваний и госпитализации [12, 15, 22]. Лечение подобного типа инфекционных заболеваний является дорогостоящим и влечет серьезные социально-экономические последствия для государства. Широко распространенная профилактическая вакцинация играет важную роль в эффективной защите людей от вирусных инфекций и может снизить экономические затраты государства.

Вакцины от COVID-19, применяемые в настоящее время в мире, классифицируются на комбинированные векторные вакцины на основе рекомбинантных аденовирусных частиц, содержащих ген S-белка SARS-CoV-2 (Гам-КОВИД-Вак (Спутник V), AstraZeneca AZD1222, Johnson & Johnson Ad26.COVS.2, JNJ-78436735), мРНК вакцины (Pfizer/BioNTech BNT162b2, Moderna mRNA-1273), однокомпонентные адъювантные пептидные вакцины (ЭпиВакКорона), цельные инактивированные вакцины (КовиВак).

Первой в мире зарегистрированной вакциной от COVID-19, одобренной 11.08.2020 Министерством здравоохранения Российской Федерации, стала вакцина Гам-КОВИД-Вак — вакцина на основе нереплицирующегося ДНК-вируса с встроенным фрагментом ДНК вируса SARS-CoV-2 [14].

Появление разных штаммов коронавирусов на фоне сообщений о снижении уровня антител после перенесенного заболевания предыдущим штаммом SARS-CoV-2 повысило неуверенность в устойчивости иммунной памяти после вакцинации, поэтому в данной работе мы исследовали уровень антител и клеточные иммунные ответы у пациентов через 3 месяца после вакцинации Гам-КОВИД-Вак.

Цель исследования — изучение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и выраженности гуморального ответа у вакцинированных Гам-КОВИД-Вак.

Материалы и методы

В проспективное исследование были включены 352 пациента, из которых 194 (119 женщин и 75 мужчин) проведена оценка иммунного

статуса и определение уровня антител к SARS-CoV-2. Базой для проведения исследования явился ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Критериями включения в исследование были: возраст 18–59 лет для мужчин и 18–49 лет для женщин с сохраненной менструальной функцией; отрицательные результаты исследования РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР и тестов на антитела IgM и IgG к SARS-CoV-2 перед вакцинацией, отсутствие в анамнезе заболевания COVID-19 и контакта с заболевшими в течение не менее 14 дней до вакцинации.

Также условиями включения в исследование были отрицательные тесты на ВИЧ, сифилис, гепатит В и гепатит С, отсутствие в анамнезе выраженных поствакцинальных реакций или поствакцинальных осложнений на предыдущее применение любых иммунобиологических препаратов.

Критериями невключения были противопоказания к вакцинации Гам-КОВИД-Вак согласно инструкции и для женщин — беременность или период лактации, морбидное ожирение ($\text{ИМТ} \geq 40,0 \text{ кг/м}^2$) для всех категорий пациентов, острые воспалительные и инфекционные заболевания в течение 3-х недель от момента полного выздоровления до периода включения в исследование, ревматические болезни, онкологические заболевания любой локализации, наличие в течение менее 3 месяцев до включения в исследование иммуномодулирующей терапии, иной вакцинации.

Критериями исключения выступали побочные проявления после введения первого компонента вакцины, требующие наблюдения, проведение процедур и/или медикаментозного лечения, не разрешенных протоколом настоящего исследования, отказ пациента от продолжения участия в исследовании или от введения 2-го компонента вакцины.

У пациентов исследование субпопуляционного состава лимфоцитов было проведено дважды — до вакцинации и через 90 дней после введения 1-го компонента вакцины Гам-КОВИД-Вак.

Взятие крови осуществляли натошак из периферической вены. Оценивали общее число лейкоцитов и лимфоцитов, субпопуляционный состав лимфоцитов по следующим маркерам дифференцировки: CD3^+ , $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$, CD19^+ , $\text{CD3}^-\text{CD56}^+\text{CD16}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD56}^+\text{CD16}^+$, $\text{CD19}^+\text{CD5}^+$, CD56^+ , а также содержание активированных лимфоцитов с фенотипом $\text{CD3}^-\text{HLA-DR}^+$, $\text{CD3}^+\text{HLA-DR}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD25}^+$, CD25^+ , $\text{CD3}^+\text{CD147}^+$, $\text{CD19}^+\text{CD147}^+$.

Фенотипирование лимфоцитов периферической крови осуществляли методом проточ-

ной цитометрии с помощью моноклональных антител (mAb), меченных FITC или PE, против антигенов CD3(FITC), CD4(PE), CD5(PE), CD8(PE), CD16+CD56(PE), CD19(FITC), CD56(PE), CD25(FITC), HLA-DR(FITC), CD147(APC) (Becton Dickinson и eBioscience, США). Лимфоцитарный гейт, позволяющий исключить из анализа другие клетки крови, выявлялся с помощью mAb к CD45, меченных PerCP (Dako, Дания). Для оценки позитивно окрашенных субпопуляций использовались соответствующие FITC- или PE-меченные изотипические IgG. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Gallios (Beckman Coulter, США) с использованием программы Kaluza.

Таблица 1. Характеристика пациенток, включенных в исследование (n = 220)

Table 1. Characteristics of female patients included in the study (n = 220)

Параметр Parameter	Значение параметра Parameter range
Возраст, лет* Age, years*	33 (26–39)
Возраст ≥ 37 лет** Age ≥ 37 years**	72 (32,7%)
Рост, м* Height, m*	1,67 (1,63–1,70)
Масса тела, кг* Body mass, kg*	62 (55–70)
ИМТ, кг/м ² * BMI, kg/m ² *	22,4 (19,9–25,0)
ИМТ ≥ 25 кг/м ² ** BMI ≥ 25 kg/m ² **	56 (25,4%)
Хронические заболевания легких** Chronic lung disease**	9 (4%)
Сердечно-сосудистые заболевания** Cardiovascular diseases**	15 (6,8%)
Артериальная гипертензия** Arterial hypertension**	3 (1,4%)
Хронические заболевания ЖКТ** Chronic diseases of the GIT**	43 (19,5%)
Хронические урологические заболевания** Chronic urological diseases**	13 (5,9%)
ЛОР-заболевания** Diseases of ENT**	30 (13,6%)
Эндокринные заболевания** Endocrine diseases**	15 (6,8%)
Аллергические заболевания** Allergic diseases**	66 (30%)
ТЭО в анамнезе** TEC in anamnesis**	3 (1,4%)

Примечание. *Me(min-max), **абс. (%), ЖКТ — желудочно-кишечный тракт, ТЭО — тромбоемболические осложнения.
Note. *Me(min-max), **abs. (%), GIT — gastrointestinal tract, TEC — thromboembolic complications.

До вакцинации определение антител классов IgM и IgG к SARS-CoV-2 проводили с помощью набора реагентов для экспресс-выявления суммарных IgM- и IgG-антител к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотке (плазме) и цельной крови иммунохроматографическим методом («ХЕМАТест анти-SARS-CoV-2» производства ООО «ХЕМА», Россия).

Через 90 дней проводили повторное взятие периферической крови для определения антител IgG к SARS-CoV-2 методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке (плазме) крови с использованием тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G(S)» (НПО «Диагностические системы», Россия). Учет результатов осуществляли на спектрофотометре Infinite F50 (Tecan, Австрия). Согласно

Таблица 2. Характеристика мужчин, включенных в исследование (n = 132)

Table 2. Characteristics of male patients included in the study (n = 132)

Параметр Parameter	Значение параметра Parameter range
Возраст, лет* Age, years*	34,5 (27,5–41)
Возраст ≥ 37 лет** Age ≥ 37 years**	55 (41,6%)
Рост, м* Height, m*	1,80 (1,78–1,85)
Масса тела, кг* BMI, kg/m ² *	77 (85–91,5)
ИМТ, кг/м ² * BMI, kg/m ² *	25,3 (23,6–27,9)
ИМТ ≥ 25 кг/м ² ** BMI ≥ 25 kg/m ² **	69 (52,3%)
Хронические заболевания легких** Chronic lung disease**	6 (4,5%)
Сердечно-сосудистые заболевания** Cardiovascular diseases**	5 (3,8%)
Артериальная гипертензия** Arterial hypertension**	3 (2,3%)
Хронические заболевания ЖКТ** Chronic diseases of the GIT**	10 (7,5%)
Хронические урологические заболевания** Chronic urological diseases**	3 (2,3%)
ЛОР-заболевания** Diseases of ENT**	6 (4,5%)
Эндокринные заболевания** Endocrine diseases**	4 (3%)
Аллергические заболевания** Allergic diseases**	20 (15,1%)

Примечание. *Me(min-max) **абс. (%), ЖКТ — желудочно-кишечный тракт.
Note. *Me(min-max), **abs. (%), GIT — gastrointestinal tract.

инструкции компании-производителя, тест предназначен для качественного и полуколичественного определения антител, для интерпретации результата используется индекс позитивности (ИП), который рассчитывается по формуле: $ИП = ОП \text{ образца} / Cut\text{-}off$, где ОП образца — величина оптической плотности образца. При $ИП > 1,2$ — образец положительный, при $ИП < 0,8$ — образец отрицательный. При значении ИП, лежащем в промежутке от 0,8 до 1,2, результат сомнительный (неопределенный).

Исследование было одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью таблиц «Microsoft Excel» и MedCalc® (версия 16.8). Для анализа количественных данных в группах сравнения определяли вид распределения данных с помощью W-теста Шапиро–Уилка. Данные представлены средней арифметической величиной и стандартным отклонением [M (SD)], при отклонении распределения данных от нормального применяли методы непараметрической статистики с оценкой медианы и верхней, и нижней квартили [Me (Q1; Q3)]. Для оценки межгрупповых различий использовали критерий Вилкоксона для попарных сравнений. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Все включенные в исследование соответствовали критериям включения, средний возраст женщин составил $33,2 \pm 7,8$ года, средний индекс массы тела — $23,1 (20,1–25,0)$ кг/м². Средний возраст мужчин составил $35,5 \pm 9,1$ года, средний индекс массы тела — $25,3 (23,6–27,9)$ кг/м².

Изначально в исследование были включены 250 женщин, подходящих по критериям включения и подписавших добровольное информированное согласие на вакцинацию и участие в исследовании. Из 250 женщин 30 не пришли на повторное обследование. Таким образом, полное обследование было проведено 220 (88%) женщинам. Клинико-anamnestические данные пациенток, включенных в исследование, представлены в табл. 1.

Средний возраст пациенток, включенных в исследование, составил 33 года, при этом $\frac{1}{3}$ пациенток были старше 37 лет. Средний ИМТ составил $22,4$ кг/м², при этом $\frac{1}{4}$ пациенток имели избыточную массу тела (≥ 25 кг/м²).

Изначально в исследование были включены 150 мужчин, подходящих по критериям включения и подписавших добровольное информированное согласие на вакцинацию и участие в исследовании. Из 150 мужчин 18 не пришли на повторное обследование. Таким образом, полностью были обследованы 132 (88%) мужчины. Клинико-anamnestические данные муж-

Таблица 3. ПППИ у пациентов, включенных в исследование [абс. (%)]

Table 3. SEAI in patients included in the study [abs. (%)]

ПППИ SEAI	Характеристика ПППИ Characteristics of SEAI			
	у женщин (n = 220) females (n = 220)		у мужчин (n = 132) males (n = 132)	
	после 1-го компонента after component 1	после 2-го компонента after component 2	после 1-го компонента after component 1	после 2-го компонента after component 2
Общее число пациентов с ПППИ Total number of patients with SEAI	78 (35,4%)	84 (38,2%)	47 (35,6%)	58 (43,9%)
Местные реакции (боль, отек, краснота) Local reactions (pain, edema, redness)	31 (14,1%)	43 (19,5%)	8 (6,1%)	11 (8,3%)
Лихорадка > 38°C Fever > 38°C	10 (4,5%)	10 (4,6%)	7 (5,3%)	1 (0,7%)
Лихорадка 37–38°C Fever 37–38°C	67 (30,5%)	63 (28,6%)	38 (28,8%)	43 (32,7%)
Лихорадка всего Fever of everything	77 (35%)	73 (33,2%)	45 (34,1%)	44 (33,4%)
Системные реакции (недомогание, головная боль, миалгии) Systemic reactions (malaise, headache, myalgia)	42 (19,1%)	49 (22,3%)	27 (20,5%)	30 (22,7%)

Примечание. ПППИ — побочные проявления после иммунизации.
Note. SEAI — side effects after immunization.

чин, включенных в исследование, представлены в табл. 2.

Средний возраст мужчин, включенных в исследование, составил 34,5 года, при этом более 1/3 пациентов были старше 37 лет. Средний ИМТ составил 25,3 кг/м², при этом 1/2 пациентов имели избыточную массу тела (≥ 25 кг/м²).

В целом вакцинация переносилась пациентами хорошо, не было отмечено серьезных побочных проявлений после иммунизации (ПППИ). Варианты ПППИ на вакцинацию представлены в табл. 3.

У 1/3 пациентов обоего пола отмечалась лихорадка, причем фебрильная лихорадка чаще

наблюдалась после введения 1-го компонента вакцины. У 1/5 пациентов отмечались системные реакции в виде недомогания, головной боли или миалгии, более часто — после введения 2-го компонента. У 15% женщин и 7% мужчин (в 2 раза реже) отмечалась местная реакция в месте введения вакцины в виде боли, отека и красноты. Более редкое указание мужчинами на местные проявления может быть связано с меньшими субъективными ощущениями, что характерно для лиц мужского пола. Реакция на введение вакцины чаще отмечалась после введения 2-го компонента и была кратковременной (1–2 дня).

Таблица 4. Параметры иммунограммы всех попарно обследованных до и после вакцинации [Ме (Q1; Q3)]

Table 4. All pairwise immunogram parameters examined before and after vaccination [Me (Q1; Q3)]

Параметры Parameters	До вакцинации Before vaccination (n = 194)	После вакцинации After vaccination (n = 194)	p-значения p-values
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Leukocytes, $\times 10^9/\text{l}$	6,32 (5,37; 7,52)	6,33 (5,37; 7,24)	0,1620
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	32,75 (28,35; 38,88)	34,35 (29,10; 38,93)	0,0913
Лимфоциты, абс. Lymphocytes, abs.	2,05 (1,77; 2,46)	2,10 (1,76; 2,49)	0,7657
CD3 ⁺ , абс.	1,51 (1,24; 1,78)	1,52 (1,31; 1,85)	0,1825
CD3 ⁺ , %	73,70 (68,45; 77,40)	74,15 (69,48; 78,33)	0,0457
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , абс.	0,86 (0,69; 1,06)	0,91 (0,73; 1,09)	0,1853
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	42,20 (37,80; 47,20)	43,40 (38,60; 48,63)	0,0050
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , абс.	0,54 (0,42; 0,71)	0,56 (0,44; 0,71)	0,1586
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	27,40 (22,50; 31,45)	27,50 (22,88; 31,73)	0,3012
CD19 ⁺ , абс.	0,21 (0,15; 0,27)	0,21 (0,16; 0,28)	0,3882
CD19 ⁺ , %	9,70 (7,75; 12,70)	10,20 (8,10; 13,03)	0,3419
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , абс.	0,02 (0,02; 0,04)	0,03 (0,01; 0,04)	0,4852
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	1,10 (0,70; 1,70)	1,15 (0,70; 1,70)	0,5029
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ , абс.	0,23 (0,15; 0,36)	0,19 (0,12; 0,31)	< 0,0001
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ , %	11,20 (7,50; 16,35)	9,50 (6,20; 14,0)	< 0,0001
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ , абс.	0,04 (0,03; 0,08)	0,04 (0,02; 0,06)	< 0,0001
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ , %	2,30 (1,30; 3,70)	1,70 (1,0; 2,90)	< 0,0001
CD3 ⁺ CD56 ⁺ , абс.	0,08 (0,05; 0,15)	0,08 (0,04; 0,13)	0,0345
CD3 ⁺ CD56 ⁺ , %	4,20 (2,40; 6,40)	3,70 (2,20; 5,90)	0,0047
CD56 ⁺ , абс.	0,37 (0,27; 0,51)	0,32 (0,23; 0,47)	0,0042
CD56 ⁺ , %	18,10 (13,60; 23,10)	15,80 (11,68; 21,30)	< 0,0001
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , абс.	0,05 (0,03; 0,07)	0,05 (0,03; 0,07)	0,3489
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	2,40 (1,70; 3,40)	2,45 (1,60; 3,30)	0,1968
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , абс.	0,26 (0,19; 0,33)	0,25 (0,19; 0,31)	0,1768
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	12,20 (9,70; 15,10)	12,10 (9,78; 14,80)	0,2655
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , абс.	0,09 (0,05; 0,13)	0,13 (0,10; 0,17)	< 0,0001
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	4,50 (2,30; 6,55)	6,20 (4,80; 7,80)	< 0,0001
CD25 ⁺ , абс.	0,11 (0,06; 0,16)	0,15 (0,11; 0,20)	< 0,0001
CD25 ⁺ , %	5,20 (2,80; 7,80)	7,35 (5,68; 9,70)	< 0,0001
CD147/CD3, MFI	4,20 (3,80; 4,68)	3,82 (3,38; 4,13)	0,0007
CD147/CD19, MFI	3,35 (3,05; 3,74)	3,08 (2,80; 3,48)	0,0297

Примечание. Оценка значимости различий параметров до и после вакцинации у одних и тех же пациентов осуществляли с помощью критерия Вилкоксона.

Note. The significant difference in parameters before and after vaccination was assessed using the Wilcoxon test.

Параметры иммунограммы были проанализированы у 194 пациентов (119 женщин и 75 мужчин) до и после вакцинации. Результаты представлены в табл. 4.

При сравнении показателей иммунограммы до и после вакцинации отмечалось повышение относительного содержания Т-лимфоцитов (CD3⁺), снижение абсолютного и относительного содержания субпопуляций естественных киллеров (NK-клеток, CD3-CD56⁺CD16⁺) и Т-клеток

с функциями естественных киллеров (NKT-клеток, CD3⁺CD56⁺CD16⁺, CD3⁺CD56⁺), повышение абсолютного и относительного содержания активированных Т-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD25⁺, а также снижение экспрессии рецептора CD147 на Т-и В-лимфоцитах.

При сравнительном анализе иммунограмм у женщин до и после вакцинации (рис. 1) было отмечено увеличение относительного содержания Т-лимфоцитов, субпопуляции Т-хелперов,

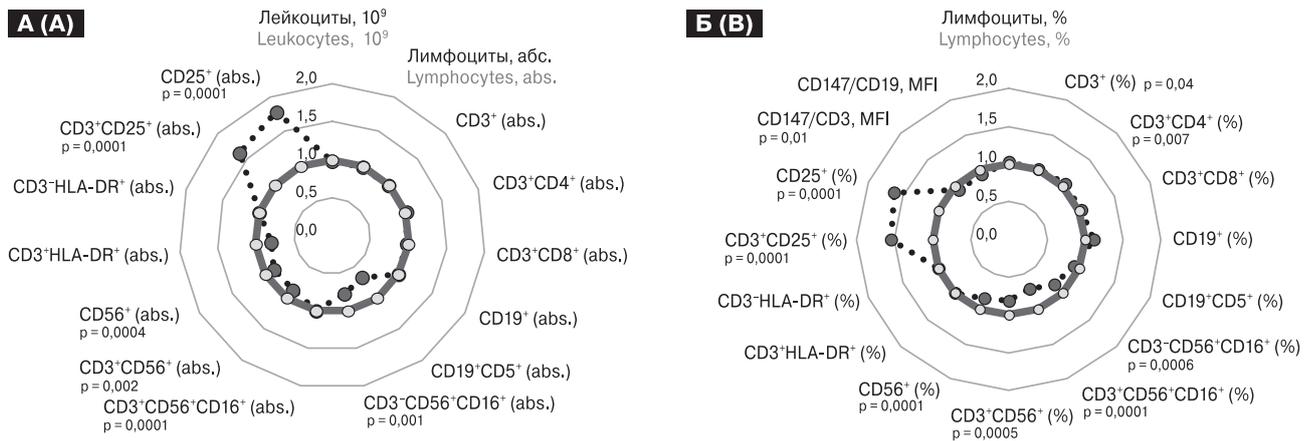


Рисунок 1. Параметры иммунограммы женщин до и после вакцинации

Figure 1. Immunogram parameters of females before and after vaccination

Примечание. Данные представлены как отношения медиан содержания конкретной субпопуляции в периферической крови обследованного после вакцинации к медианам той же субпопуляции до вакцинации: А — отношения медиан абсолютного содержания субпопуляции; Б — отношения медиан относительного содержания субпопуляции. Темно-серой линией указан уровень равенства отношений.

Note. The data are presented as ratio between the median level for any peripheral blood cell subset examined after and before vaccination: A — the ratio between medians of the absolute cell subset level; B — the ratio between medians of the relative cell subset level. The dark grey line indicates the level of relation equality.

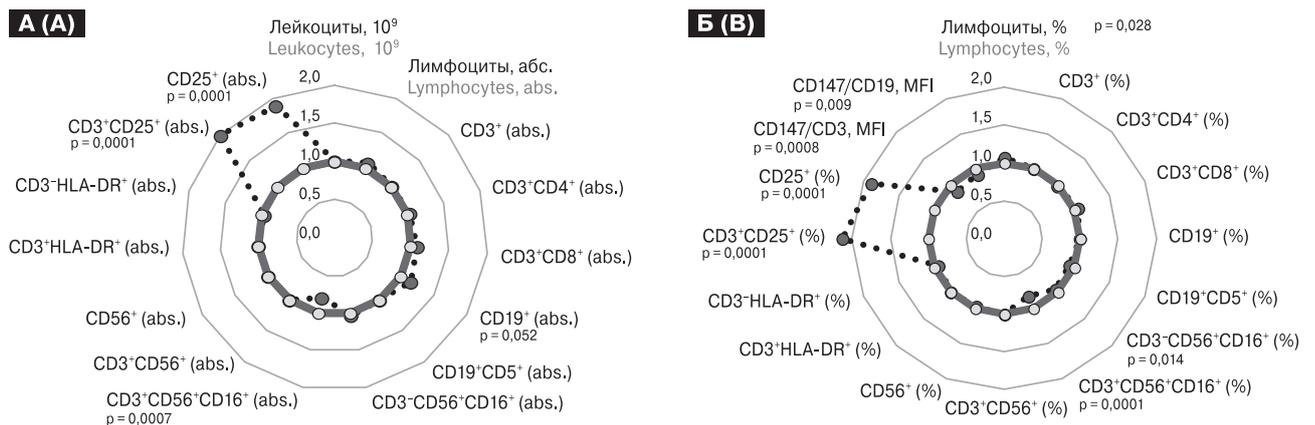


Рисунок 2. Параметры иммунограммы мужчин до и после вакцинации

Figure 2. Immunogram parameters of males before and after vaccination

Примечание. Данные представлены как отношения медиан содержания конкретной субпопуляции в периферической крови, обследованного после вакцинации к медианам той же субпопуляции до вакцинации: А — отношения медиан абсолютного содержания субпопуляции; Б — отношения медиан относительного содержания субпопуляции. Темно-серой линией указан уровень равенства отношений.

Note. The data are presented as ratio between the median level for any peripheral blood cell subset examined after and before vaccination: A — the ratio between medians of the absolute cell subset level; B — the ratio between medians of the relative cell subset level. The dark grey line indicates the level of relation equality.

повышение абсолютного и относительного содержания активированных Т-лимфоцитов, снижение абсолютного и относительного содержания субпопуляций естественных киллеров, естественных киллерных Т-клеток, а также снижение экспрессии рецептора CD147 на Т-лимфоцитах.

Сходные закономерности выявлены и при исследовании иммунограммы у мужчин (рис. 2), за исключением увеличения содержания лимфоцитов и снижения экспрессии рецептора CD147 как на Т-, так и на В-лимфоцитах. Изменений в показателях Т-клеточного звена иммунитета выявлено не было.

Высокая эффективность вакцины подтверждалась образованием специфических противовирусных антител класса G к SARS-CoV-2 у 97,5% вакцинированных женщин и у 92,3% вакцинированных мужчин. Индекс позитивности у женщин составил 9,65 (5,0–11,6), у мужчин — 9,5 (4,8–11,6).

Обсуждение

Полученные нами данные подтверждают иммуногенность вакцины Гам-КОВИД-Вак: у иммунизированных людей были обнаружены антитела против SARS-CoV-2, что представляется закономерным, поскольку именно эта вакцина обеспечивает представление антигенных детерминант S-белка коронавируса и по I и по II классу МНС и, следовательно, вызывает формирование полноценного гуморального иммунного ответа.

В результате проведенной работы были выявлены изменения в иммунограмме после вакцинации в виде повышения уровня активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺) и уменьшение содержания в периферической крови натуральных киллерных клеток (CD56⁺ и CD16⁺). CD25⁺ является маркером ранней активации субпопуляций Т-лимфоцитов и представляет собой α-цепь рецептора IL-2. Данный показатель отражает способность лимфоцитов к пролиферации и дифференцировке, характеризует функциональное состояние активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺) [2]. В клинической практике часто исследуют субпопуляцию CD3⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов. Повышение их количества, так же, как и общей популяции CD25⁺-лимфоцитов может свидетельствовать, с одной стороны, о ранней стадии воспалительного процесса любой природы [10], а с другой — о формировании среди этих клеток минорной субпопуляции Т-лимфоцитов с естественной регуляторной функцией и экспрессией транскрипционного фактора FOXP3 и о затухании (супрессии) воспалительного процесса любой природы. В анализируемом случае повышение содержания акти-

вированных Т-лимфоцитов (с маркером CD25⁺) может свидетельствовать о формировании субпопуляции супрессорных Т-лимфоцитов, способствующих снижению интенсивности воспалительного процесса, вызванного вакцинацией.

Поскольку вакцинация Гам-КОВИД-Вак вызывает процесс, аналогичный вирусному инфекционному процессу, снижение в периферической крови вакцинированных спустя 2–3 месяца после вакцинации содержания субпопуляций с естественной киллерной активностью (клеток с маркерами CD56⁺ и CD16⁺) может свидетельствовать о затухании воспалительного процесса вирусной природы, что подтверждает высказанное выше предположение. С другой стороны, в настоящее время считается установленным, что при стрессе у здоровых людей наблюдается временное изменение показателей функций иммунной системы [1]. Введение антигена в организм само по себе вызывает реакцию, напоминающую стресс. Известно, что субпопуляции клеток с естественной киллерной активностью (CD56⁺ и CD16⁺) могут снижаться на фоне стресса при временном снижении сопротивляемости организма к стрессорным факторам [6, 20], одним из которых также может быть вакцинация, тем более что все выявленные значения содержания NK-клеток у обследованных и до и после вакцинации были в пределах референсных диапазонов (CD3⁺CD56⁺CD16⁺ (абс.) — 0,08–0,76; CD3⁺CD56⁺CD16⁺ — 8–19%). Нельзя исключить влияния и других дополнительных стрессорных факторов, поскольку исследование иммунного статуса осуществлялось через 2–3 месяца после введения 2-го компонента вакцины.

Кроме того, в представленном исследовании выявлено снижение после вакцинации экспрессии CD147 на лимфоцитах. CD147 — трансмембранный гликопротеин, экспрессирующийся не только на всех лейкоцитах, но и на тромбоцитах и эндотелиальных клетках. Известно, что он может действовать как корецептор для SARS-CoV-2, связываясь с рецептор-связывающим доменом S-белка шипа (RBD) [9, 19]. И хотя на сегодняшний день не выявлено прямого взаимодействия между RBD и CD147, тем не менее выявленное нами снижение экспрессии CD147 может отражать формирование после вакцинации защиты клеток хозяина от проникновения вируса SARS-CoV-2.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют, во-первых, о том, что вакцинация индуцирует специфический гуморальный иммунный ответ, который определяется через 3 месяца после вакцинации, а во-вторых, не приводит к серьезным

нарушениям в функционировании иммунной системы, которые могли бы найти отражение в субпопуляционном составе лимфоцитов.

Таким образом, из представленных данных можно сделать вывод об эффективности вакцинации Гам-КОВИД-Вак. Однако следует продолжать наблюдения для оценки безопасности вакцинации против SARS-CoV-2, вероятности последующей заболеваемости и характера течения COVID-19, поскольку известно, что им-

мунный ответ часто бывает гетерогенным и варьируется у разных людей в зависимости от возраста, окружающей среды и индивидуального состояния здоровья не только на конкретный патоген, но и на вакцинацию [3, 5].

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Гаврилов Ю.В., Корнеева Е.А. Взаимодействие нервной и иммунной систем при стрессе // Медицинский академический журнал. 2009. Т. 9, № 1. С. 11–27. [Gavrilov Yu.V., Korneeva E.A. Interaction of the nervous and immune systems under stress. *Meditinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2009, vol. 9, no. 1, pp. 11–27. (In Russ.)] doi: 10.17816/MAJ9111-27
2. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology. Moscow, GEOTAR-Media, 2010. 752 p. (In Russ.)]
3. Bajgain K.T., Badal S., Bajgain B.B., Santana M.J. Prevalence of comorbidities among individuals with COVID-19: a rapid review of current literature. *Am. J. Infect. Control*. 2021, vol. 49, no. 2, pp. 238–246. doi: 10.1016/j.ajic.2020.06.213
4. Cui J., Li F., Shi Z.L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2019, vol. 17, no. 3, pp. 181–192. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9
5. Davies N.G., Klepac P., Liu Y., Prem K., Jit M.; CMMID COVID-19 working group, Eggo R.M. Age-dependent effects in the transmission and control of COVID-19 epidemics. *Nat. Med.*, 2020, vol. 26, no. 8, pp. 1205–1211. doi: 10.1038/s41591-020-0962-9
6. Dorin Dragos D., Tanasescu M. The effect of stress on the defense systems. *J. Med. Life*, 2010, vol. 3, no. 1, pp. 10–18.
7. Fani M., Teimoori A., Ghafari S. Comparison of the COVID-2019 (SARS-CoV-2) pathogenesis with SARS-CoV and MERS-CoV infections. *Futur. Virol.*, 2020. doi: 10.2217/fvl-2020-0050
8. Florindo H.F., Kleiner R., Vaskovich-Koubi D., Acurcio R.C., Carreira B., Yeini E., Tiram G., Liubomirski Y., Satchi-Fainaro R. Immune-mediated approaches against COVID-19. *Nat. Nanotechnol.*, 2020, vol. 15, no. 8, pp. 630–645. doi: 10.1038/s41565-020-0732-3
9. Guillot S., Delaval P., Brinchault G., Caulet-Maugendre S., Depince A., Lena H., Delatour B., Lagente V., Martin-Chouly C. Increased extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression in pulmonary fibrosis. *Exp. Lung Res.*, 2006, vol. 32, no. 3–4, pp. 81–97. doi: 10.1080/01902140600710512
10. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003, vol. 299, no. 5609, pp. 1057–1061. doi: 10.1126/science.1079490
11. Jiang F., Deng L., Zhang L., Cai Y., Cheung C.W., Xia Z. Review of the clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J. Gen. Intern. Med.*, 2020, vol. 35, no. 5, pp. 1545–1549. doi: 10.1007/s11606-020-05762-w
12. Jones I., Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *Lancet*, 2021, vol. 397, no. 10275, pp. 642–643. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00191-4
13. Lauer S.A., Grantz K.H., Bi Q., Jones F.K., Zheng Q., Meredith H.R., Azman A.S., Reich N.G., Lessler J. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Ann. Intern. Med.*, 2020, vol. 172, no. 9, pp. 577–582. doi: 10.7326/M20-0504
14. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L.; Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*, 2021, vol. 397, no. 10275, pp. 671–681. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8
15. Nogrady B. Mounting evidence suggests Sputnik COVID vaccine is safe and effective. *Nature*, 2021, vol. 595, no. 7867, pp. 339–40. doi: 10.1038/d41586-021-01813-2
16. Petersen E., Koopmans M., Go U., Hamer D.H., Petrosillo N., Castelli F., Storgaard M., Al Khalili S., Simonsen L. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 9, pp. e238–e244. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30484-9
17. 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, no. 6, pp. 363–374. doi: 10.1038/s41577-020-0311-8
18. Tyrrell D.A., Bynoe M.L. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *Br. Med. J.*, 1965, vol. 1, no. 5448, pp. 1467–1470. doi: 10.1136/bmj.1.5448.1467
19. Wang K., Chen W., Zhang Z., Deng Y., Lian J.Q., Du P., Wei D., Zhang Y., Sun X.X., Gong L., Yang X., He L., Zhang L., Yang Z., Geng J.J., Chen R., Zhang H., Wang B., Zhu Y.M., Nan G., Jiang J.L., Li L., Wu J., Lin P., Huang W., Xie L., Zheng Z.H., Zhang K., Miao J.L., Cui H.Y., Huang M., Zhang J., Fu L., Yang X.M., Zhao Z., Sun S., Gu H., Wang Z., Wang C.F., Lu Y., Liu Y.Y., Wang Q.Y., Bian H., Zhu P., Chen Z.N. SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. *bioRxiv*, 2020. doi: 10.1101/2020.03.14.988345

20. Whiteside T.L., Herberman R.B. Role of human natural killer cells in health and disease. *Clin. Diagnostic. Lab. Immunol.*, 1994, vol. 1, no. 2, pp. 125–133. doi: 10.1128/cdli.1.2.125-133.1994
21. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.R., Zhu Y., Li B., Huang C.L., Chen H.D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.D., Liu M.Q., Chen Y., Shen X.R., Wang X., Zheng X.S., Zhao K., Chen Q.J., Deng F., Liu L.L., Yan B., Zhan F.X., Wang Y.Y., Xiao G.F., Shi Z.L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020, vol. 579, no. 7798, pp. 270–273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7
22. Zhou Y., Jiang S., Du L. Prospects for a MERS-CoV spike vaccine HHS Public Access. *Expert Rev. Vaccines.*, 2018, vol. 17, no. 8, pp. 677–686. doi: 10.1080/14760584.2018.1506702

Авторы:

Инвиева Е.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздрава России (ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России), Москва, Россия;

Вторушина В.В., к.м.н., врач иммунолог-аллерголог ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия;

Драпкина Ю.С., к.м.н., врач отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. профессора Б.В. Леонова ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия;

Кречетова Л.В., д.м.н., зав. лабораторией клинической иммунологии ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия;

Долгушина Н.В., д.м.н., профессор, зам. директора — руководитель департамента организации научной деятельности ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия;

Хайдуков С.В., д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории углеводов ФНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия.

Authors:

Inviyeva E.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Clinical Immunology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Vtorushina V.V., PhD (Medicine), Immunologist-Allergist, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Drapkina J.S., PhD (Medicine), Obstetrician-Gynecologist, B.V. Leonov Department of Assisted Technologies for the Treatment of Infertility, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Krechetova L.V., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Clinical Immunology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Dolgushina N.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director — Head of R&D Department, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Khaidukov S.V., PhD, MD (Biology), Senior Researcher, Carbohydrate Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry named after M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov RAS, Moscow, Russian Federation.

THE NON-PROTEIN FRACTION OF EMBRYONIC STEM CELL SECRETOME EXERTS ANTIBACTERIAL EFFECTS AGAINST ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIAL STRAINS

D.G. Kaigorodov^a, A.D. Kaigorodova^b

^a LLC Institute for Scientific Research Biotechnologies “Mitokey”, Tyumen, Russian Federation

^b Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Abstract. In recent years, it has been extremely evident to seek out for new antibacterial agents, because the burgeoning problem of antibiotic resistance and the toxicity of many antimicrobial compounds has forced scientists to turn attention to alternative approaches. Investigating stem cell secretomes, including the non-protein portion, to find new antimicrobials is a promising area in the field. We examined an effect of the non-protein portion within the embryonic stem cell secretome on various bacterial strains, including antibiotic-resistant members. The non-protein fraction of the stem cell secretome was obtained by preparative high-performance liquid chromatography. Bactericidal activity was tested against eight museum bacterial strains and 206 clinical strains by comparing the secretome-related effects on growth of bacterial cultures. The museum strains showed some dose-dependent effects at concentrations of 25–100 µg/ml. Some bactericidal activity was shown at a concentration of 100 µg/ml against the clinical strains of Gram-negative microorganisms of different species, but bacterial sensitivity to the secretome fraction varied, with growth stimulation being detected in some strains. Applying non-protein fraction of the stem cell secretome at higher concentrations of 100–1000 µg/ml showed no dose-dependent effect. The clinical strains of *E. coli* and *P. aeruginosa* were shown to have reduced bactericidal activity after 24-hour incubation. Thus, this study has shown that the non-protein fraction of the embryonic stem cell secretome exerts bactericidal effects against some bacterial strains. However, more detailed studies are needed to identify a mechanism of action and to determine the most effective dose as well as frequency of administration.

Key words: secretome, embryonic stem cells, antibacterial activity, antimicrobial properties, bactericidal effect.

НЕБЕЛКОВАЯ ФРАКЦИЯ СЕКРЕТОМА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБЛАДАЕТ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ЭФФЕКТОМ, В ТОМ ЧИСЛЕ ПРОТИВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ

Кайгородов Д.Г.¹, Кайгородова А.Д.²

¹ ООО НИИ Биотехнологии «Митокей», г. Тюмень, Россия

² ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия

Резюме. В последние годы чрезвычайно актуален поиск новых возможных антибактериальных препаратов, а проблема антибиотикорезистентности и токсичность химиопрепаратов заставляет ученых обращать внимание на альтернативные противомикробные средства. Изучение применения секретама стволовых клеток, в том

Адрес для переписки:

Кайгородов Денис Григорьевич
625000, Россия, г. Тюмень, ул. Республики, 142, офис 314, 315,
ООО НИИ Биотехнологии «Митокей».
Тел.: 8 922 269-22-22 (служебн., моб.).
E-mail: kaigorodov_denis@rambler.ru

Contacts:

Denis G. Kaigorodov
625000, Russian Federation, Tyumen, Respubliki str., 142, off. 314, 315,
LLC Institute for Scientific Research Biotechnologies “Mitokey”.
Phone: +7 922 269-22-22 (office, (mobile)).
E-mail: kaigorodov_denis@rambler.ru

Для цитирования:

Кайгородов Д.Г., Кайгородова А.Д. Небелковая фракция секретама эмбриональных стволовых клеток обладает антибактериальным эффектом, в том числе против антибиотикорезистентных штаммов бактерий // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1061–1068. doi: 10.15789/2220-7619-NPF-1940

Citation:

Kaigorodov D.G., Kaigorodova A.D. The non-protein fraction of embryonic stem cell secretome exerts antibacterial effects against antibiotic-resistant bacterial strains // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1061–1068. doi: 10.15789/2220-7619-NPF-1940

числе его небелковой части, является перспективной областью современной науки. В нашем исследовании было изучено влияние небелковой части секретома эмбриональных стволовых клеток на различные штаммы микроорганизмов, в том числе антибиотикорезистентные. Небелковую часть секретома стволовых клеток получали при помощи препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Тестирование бактерицидной активности производилось в отношении 8 музейных штаммов бактерий и 206 клинических штаммов микроорганизмов методом сравнения влияния секретома на рост бактериальных культур. При первичном анализе было выявлено, что на музейных штаммах в концентрации 25–100 мкг/мл исследуемый секретом имеет некоторый дозозависимый эффект. При оценке бактерицидной активности в концентрации 100 мкг/мл в отношении клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов разной видовой принадлежности было показана различная чувствительность штаммов к секретому, причем у некоторых штаммов обнаружена стимуляция роста. Применение более высоких концентраций 100–1000 мкг/мл не выявило дозозависимого эффекта. При этом на клинических штаммах *E. coli* и *P. aeruginosa* было показано снижение бактерицидной активности через сутки инкубации. Таким образом, проведенное исследование показало, что небелковая фракция секретома эмбриональных стволовых клеток также обладает бактерицидным эффектом. Однако требуются более детальные исследования для выявления механизма действия и определения наиболее эффективной дозы и частоты применения.

Ключевые слова: секретом, эмбриональные стволовые клетки, антибактериальная активность, противомикробные свойства, бактерицидный эффект.

Introduction

The problem of antibiotic resistance has reached critical proportions [1, 29]. Drugs used to treat diseases caused by antibiotic-resistant strains of microorganisms are often highly toxic, and their effectiveness decreases year after year [20]. Mutations of bacteria under the influence of environmental factors and antibiotics are forcing scientists around the world to search for new drugs that can bypass resistance mechanisms [1, 17].

The use of stem cells in the treatment of a variety of diseases has been widely studied. For example, many studies have confirmed their ability to home in on and integrate into damaged areas of the body, undergo proliferation and repair the tissues [15]. There is evidence that human adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) when administered systemically can reduce inflammation in colitis and protect against sepsis [9]. In a study by Krasnodembskaya et al. it was shown that human bone marrow-derived MSCs had direct antimicrobial activity, in part due to secretion of the peptide cathelicidin hCAP-18/LL-37 [13]. Several proof-of-concept studies demonstrated that MSCs acted synergistically with current antibiotics to penetrate bacterial biofilms [12], and showed antifungal [2, 39], antiviral [12, 30], and antiparasitic properties [12, 32]. However, the direct application of embryonic stem cells has a number of limitations, due to the risk of teratoma development [33].

The phenomenon of biological regulation through cellular interaction by means of various secreted substances has been actively studied in recent years [40]. It is accepted that the secretome is the sum of molecules and factors secreted by the cell into the external environment [35]. There are obvious advantages to using secreted compounds over stem cells directly because the cells may die or fail to reach the site of action, they cannot be precisely dosed, and there

is a risk of tumor formation [19]. The therapeutic potential of the stem cell secretome has been shown for treating a range of diseases, such as myocardial infarction [34], colitis [14], Alzheimer's disease [22] and even alopecia [26]. There is evidence that the secretome has immunomodulatory effects and promotes cell regeneration, migration and proliferation [18]. The protein part of the secretome exhibits anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, antifungal, antiparasitic, antioxidant, and angiogenic activities [23, 30]. Studies in recent years have consistently supported the hypothesis that stem cells that have direct antimicrobial activity also produce a secretome capable of inhibiting pathogens. Given the current epidemiological situation with the continuing pandemic, it has been suggested that this secretome may be effective in the treatment of COVID-19-induced pneumonia [19].

However, the compounds responsible for the antibacterial effects of the secretome and the molecular mechanism of their action are still being sought. Some of the effects may be due to the presence of protein factors such as proteases, cytokines, growth factors, etc., but data about the effects of the non-protein secretome fraction is sparse. Thus, the aim of this study was to investigate the antibacterial effect of the non-protein fraction of an embryonic stem cell secretome on various strains of microorganisms, including antibiotic-resistant ones.

Materials and methods

Isolation of cells from embryos and culturing. The source of the cells was an animal embryo before the appearance of histocompatibility antigen (HCA)-containing cells of CD34⁺ phenotype. Sterile material in 2±0.3 ml of 0.9% sodium chloride was placed in the working chamber of an automatic dense tissue preparation system (Medimachine, Becton Dickinson, USA). Disaggregation was performed

for 30 seconds at 23–25°C. The cell suspension was then removed using a sterile syringe. The working chamber was washed three times with 1 ml of 0.9% NaCl, and the washes were added to the cells. Afterwards, the suspension was filtered through a nylon membrane (Falcon, Becton Dickinson, USA) with a pore diameter of 40 µm. Cells were collected by centrifugation at 400g for 5 min at 25°C and supernatants were discarded.

Cell viability was determined using the vital dye, 7-amino-actinomycin D RUO (7AAD) (Beckman Coulter, USA) on a Cytomics FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, USA). Viable cells were scored by registering two parameters, volume/lateral light scattering (SSLin) and fluorescence (7-AAD). Cell phenotype was determined using specific monoclonal antibodies (Beckman Coulter, USA) designed for *in vitro* diagnostics to identify cells expressing CD34 antigen. Only CD34⁺ cells with a viability of at least 90±5% were selected. Lower viability samples were discarded. Using 0.9% sodium chloride, the concentration of cells in the sample was adjusted to 1.25×10^6 cells per ml. Cells were incubated in culture vials (PP Techno Plastic Products AG, Switzerland) with barriers inside the vials creating a growth surface of 115 cm² for 24 hours at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Isolation of non-protein stem cell secretome fraction. After one day, the culture supernatants containing secreted products of CD34⁺ cells were collected and lyophilized. The lyophilizates were dissolved in distilled water and the non-protein compounds were separated using an LC-20 Prominence polyblock high performance liquid chromatography system (Shimadzu, Japan) equipped with an LC-AP pump, SIL-10a autodispenser, SPD-20A spectrophotometric detector, TSKgel Amide-80 column (no. 0014460; 10 µm, 21.5 mm ID × 30 cm L) and FRC-10A fraction collector. The sample volume was 5 ml. The mobile phase consisted of distilled water and acetonitrile in a 1:1 volume ratio at a flow rate of 10 ml/min. LabSolution software was used to set up the run parameters to collect the non-protein fractions and reject the protein-containing ones. Subsequent analysis using an Agilent 6850 gas chromatograph equipped with an Agilent 5973N mass-selective detector on a Phenomenex ZB-5MS column (30 m × 250 µm, 0.25 µm) as well as a Milichrom A-02 liquid micro-column chromatograph (Econova, Novosibirsk, Russia) with a Kromasil 100-5-C18 column showed no proteins or peptides in the analyzed fractions. The resulting non-protein fractions secreted from embryonic stem cells were lyophilized, dissolved in distilled water at concentrations of 50, 100, 150, 200, 500, 1000 and 2000 µg/ml and tested for antibacterial activity.

Bacterial strains selected for determination of antibacterial activity of non-protein stem cell secretome products. Bactericidal activity tests were performed

against eight museum strains of bacteria and 206 clinical strains of Gram-negative microorganisms highly resistant to antibiotics. The museum strains included both Gram-negative and Gram-positive bacteria: *Escherichia coli* K12 (GISC No. 24036), *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538P, *S. xyloso* No55/5 (ICVS UrO RAS), *S. epidermidis* No.711 (ICVS UrO RAS), *Micrococcus luteus* var. *lysodeikticus* ATCC 15307. The 120 clinical strains of Gram-negative bacteria highly resistant to antibiotics included 22 strains of *Escherichia coli*, 57 strains of *Acinetobacter baumannii*, 43 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, and 84 strains of *Klebsiella pneumoniae*.

Methodology for determining bactericidal activity. We used the method for determining the bactericidal activity of blood serum [15], adapted to test the bactericidal activity of the different concentrations of the fractions. Agar cultures of target bacteria were suspended in isotonic NaCl and counted. Aliquots of 5×10^8 bacteria were introduced into each well of a 96-well plate and 25 µl of secretome fraction at 50, 100, 150 and 200 µg/ml were added to give final concentrations of 25, 50, 75 and 100 µg/ml. Stock solutions of 1000 and 2000 µg/ml were used for the final concentrations of 500 and 1000 µg/ml. For the control, 25 µl of isotonic NaCl alone was added. The cells were incubated for 20 min at 37°C and then 200 µl of meat-peptone broth was added and the plate was incubated for 4 hours at 37°C. The optical density (OD) of the bacterial cultures in the cells was measured using a Multiscan Accent microplate spectrometer (Thermo Electron, Finland) at $\lambda = 492$ nm. Each variant of experiment and control was run with three replicates, and OD readings were averaged.

The bactericidal index (BI, %) was calculated according to the following formula to quantitate the effect of the secretome fraction on the test bacteria:

$$BI = (ODc - ODo)/ODc \times 100\%,$$

where ODc and ODo are the optical densities of control and experimental cultures, respectively. Strains with BI > 10% were considered sensitive. If the OD of the experimental culture exceeded that of the control culture (ODo > ODc), the growth stimulation index (GSI, %) was calculated according to the formula:

$$GSI = ODo/ODc \times 100\%,$$

where ODc and ODo are the optical densities of control and experimental cultures, respectively. Growth stimulation was counted at GSI > 10%. If BI and GSI values were less than 10%, the bacterial strains were classified as indifferent.

The strains of *E. coli* (n = 11) and *P. aeruginosa* (n = 11) that showed relatively high resistance to the bactericidal action of secretome fractions at a concentration of 100 µg/ml, were chosen to evaluate

Table 1. Indices of bactericidal activity of secretome against museum strains of microorganisms (considering a concentration gradient of 25–100 µg/ml) after 4 hours of incubation

Museum bacterial strains studied	BI when using different concentrations of secretome			
	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml
<i>E. coli</i> K12	16.5	38.5	50.7	87.9
<i>E. coli</i> ATCC 25922	65.8	75.8	85.0	85.8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11.1	44.4	77.8	80.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	79.3	82.6	86.0	86.5
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	54.6	84.5	87.6	88.7
<i>S. xylosus</i> No55/5	61.2	61.4	68.2	68.2
<i>S. epidermidis</i> No711	12.8	20.5	25.6	30.8
<i>Micrococcus luteus</i> var. <i>lysodeikticus</i> ATCC 15307	22.6	24.5	30.9	39.2
Median (25–75)	41.90 (16.42–62.48)	52.90 (36.14–84.80)	72.98 (47.66–82.94)	82.92 (82.92–86.77)

the sensitivity to high concentrations of the fraction (100–1000 µg/ml final concentration range) and were incubated for 3, 4, 5 and 24 hours.

Statistical analysis. The analysis and visualization of the data was carried out using the RStudio for MacOS (version 1.3.1056), an open-source software package in the R programming language. Data normality was estimated by the Shapiro–Wilk test. Data were presented as median (25–75) using descriptive statistics (packages “skimr”, “psych”, “ggpubr”, “ggplot2”). To assess the differences between groups, the Kruskal–Wallis test was used, followed by Dunn’s post hoc test for multiple comparisons. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

The bactericidal activity of the non-protein part of the stem cell secretome was preliminarily tested on museum strains of microorganisms at concentrations of 25–100 µg/ml. It was found that the secretome fractions exhibited bactericidal activity against all eight museum strains (Table 1). The dose-dependent bactericidal activity was most clearly manifested on *Escherichia coli* K12 and *Pseudomonas aeruginosa* ATSS 27853 than on the other bacterial strains studied,

and the highest values of bactericidal activity of the secretome (at 100 µg/ml concentration) were recorded with Gram-negative bacteria (*E. coli*, *P. aeruginosa*) as well as with strains of *S. aureus*. Coagulase-negative staphylococci (*S. xylosus* and *S. epidermidis*) and micrococcus showed less sensitivity.

Since the highest bactericidal activity was found for a concentration of 100 µg/ml, we additionally evaluated the bactericidal activity at a concentration of 100 µg/ml against clinical strains of Gram-negative bacteria of different species (Table 2). Among the clinical strains studied, it was found that a significant proportion of the isolates exhibited sensitivity to the bactericidal action of secretome fraction. Thus, the range of BI variation was rather wide: from 12.1 to 89.1% for *E. coli*, from 11.0 to 94.7% for *A. baumannii*, from 12.0 to 78.2% for *P. aeruginosa*, and from 10.5 to 100.0% for *K. pneumoniae*. When comparing BI in susceptible strains, no significant differences were found between the clinical strains of *E. coli*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. However, there was a significant difference in the BI between *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* ($p = 0.0043$). The highest sensitivity was found for *K. pneumoniae* strains, 95.2%. Some strains (from 3.6 to 32.6%) were indifferent to the action of the fractions and some

Table 2. Bactericidal activity (BI) values (concentration – 100 µg/ml) against clinical strains of Gram-negative microorganisms of different species after 4 hours incubation

Clinical bacterial strains studied	Sensitivity parameters			Resilience/Resistance parameters			
	Proportion of susceptible strains (%)	BI range (min-max, %)	BI value in susceptible strains (%)	Proportion of indifferent strains (%)	Proportion of strains with growth stimulation (%)	GSI range (min-max, %)	GSI value (%)
<i>E. coli</i> (n = 22)	72.7	12.1–89.1	58.4 (26.5–68.4)	9.1	18.2	16.7–36.7	22.7 (18.1–29.3)
<i>A. baumannii</i> (n = 57)	61.8	11.0–94.7	53.0 (16.4–75.5)	12.3	26.3	10.0–54.3	19.0 (14.3–24.5)
<i>P. aeruginosa</i> (n = 43)	48.8	12.0–78.2	31.7 (18.0–40)	32.6	18.6	10.0–31.6	19.2 (15.7–21.3)
<i>K. pneumoniae</i> (n = 84)	95.2	10.5–100.0	56.4 (31.9–85.6)	3.6	1.2	–	31.8

Note. Data are presented as median (25–75).

actually showed an increase in growth (up to 26.3% in *A. baumannii*).

The bactericidal activity of the non-protein secretome was assessed at higher concentrations (100–1000 µg/ml), and it was found that after 4 hours of incubation the sensitivity was slightly higher for *E. coli* than for *P. aeruginosa* at all concentrations tested (Fig. 1). Significant differences were found between the groups studied at 250 µg/ml ($p = 0.019$) and 500 µg/ml ($p = 0.039$). At the same time, no statistically significant differences were found when using 100 and 1000 µg/ml. It should be noted that in the range of concentrations studied (100–1000 µg/ml), the secretome showed no clear dependence of bactericidal effect on concentration. However, an additional study measuring bactericidal activity indices over a wider incubation time from 3 to 24 hours showed that after 24 hours, all secretome concentrations exhibited very low activity (Fig. 2). A significant difference between 3 and 24 hours of incubation ($p = 0.0034$) was detected in the clinical *E. coli* strains at a concentration of 100 µg/ml. At a concentration of 250 µg/ml a significant difference was found between 3 and 24 hours ($p = 0.0040$), and 4 and 24 hours ($p = 0.0062$). The same differences were shown for 500 µg/ml concentration: 3 and 24 hours ($p = 0.0402$), 4 and 24 hours ($p = 0.0366$); and 1000 µg/ml: 3 and 24 hours ($p = 0.0084$), 4 and 24 hours ($p = 0.0051$). Interestingly, there was no dose-dependent effect: the BI's at different concentrations of secretome at each time interval did not differ significantly from each other, maintaining a tendency for the activity to decrease by 24 hours

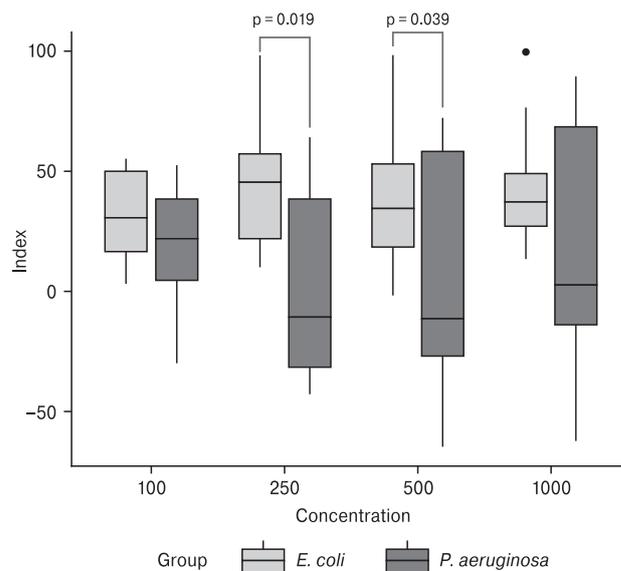


Figure 1. Indices of the bactericidal activity of secretome against *E. coli* and *P. aeruginosa* (considering a concentration gradient of 100–1000 µg/ml) after 4 hours of incubation

Note. An index value below 0 indicates a stimulating effect, index levels of 0–10 indicate an indifferent strain.

of incubation at all concentrations (Fig. 2) In a model of clinical strains of *P. aeruginosa* there was also no dose-dependent effect: the bactericidal activity indices studied at different concentrations of secretome at each time interval did not differ significantly from each other at any concentration (Fig. 1). In evaluating the temporal differences at the 100 µg/ml con-

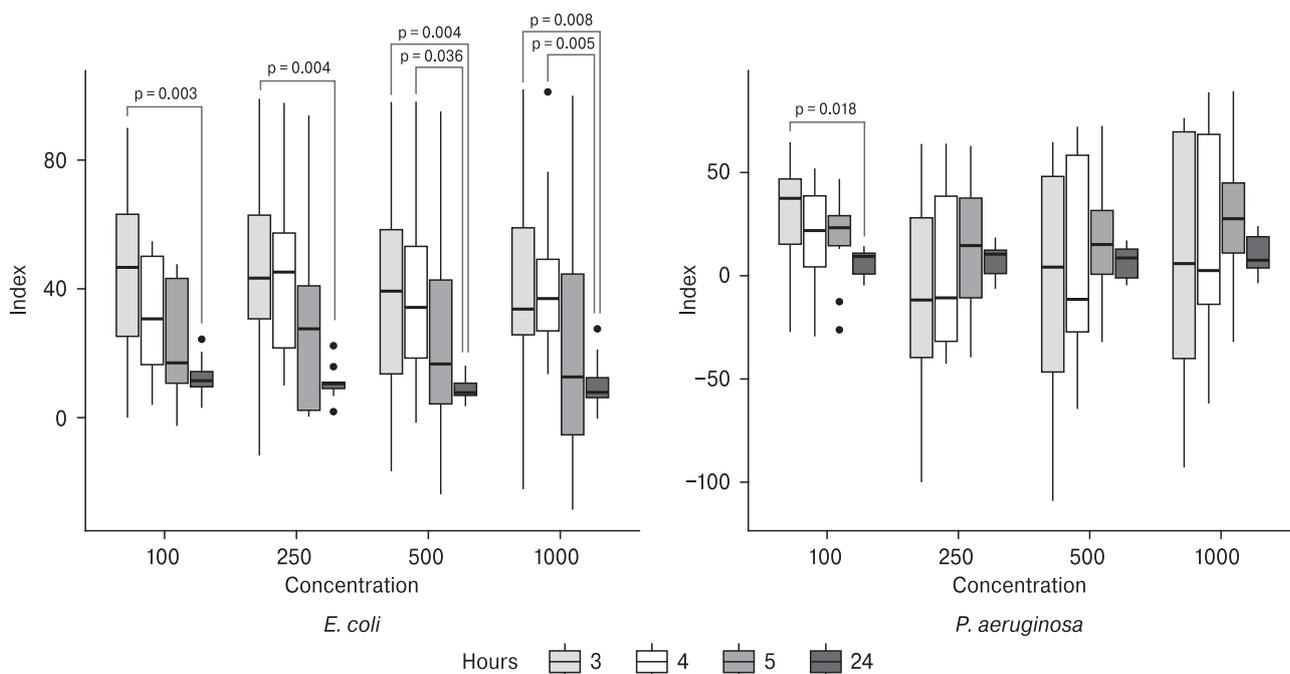


Figure 2. Indices of the bactericidal activity of secretome on clinical strains of *E. coli* (n = 11) and *P. aeruginosa* (n = 11) (considering a concentration gradient of 100–1000 µg/ml)

Note. An index value below 0 indicates a stimulatory effect, index levels of 0–10 indicate an indifferent strain.

centration, a significant difference was observed between 3 and 24 hours of incubation with the fraction ($p = 0.018$).

Discussion

This study showed a bactericidal effect of the non-protein part of the embryonic stem cell secretome on various museum and clinical strains of bacteria. Studies in recent years on the feasibility of using different stem cell secretomes have also shown similar results [3, 31, 37]. Bahroudi et al., showed that the secretome of unstimulated mesenchymal stem cells of bone marrow origin had a significant dose-dependent antibacterial effect against *Vibrio cholerae* [3]. In a study by Saberpour et al., nanocapsules containing MSC supernatant were effective against multidrug-resistant *V. cholerae* [31]. A direct antibacterial effect of MSCs against *Staphylococcus aureus* has been shown by Yagi et al. [37]. One interesting observation in our study was the absence of a dose-dependent bactericidal effect at concentrations above 100 µg/ml, although a significant reduction in action was detected at 24 hours of incubation. Currently, there are no data in the literature on the effect of lyophilized secretome at different concentrations and incubation times on pathogenic microbes, but there is evidence showing the efficacy of lyophilized MSC secretome at a single concentration in a gel with hyaluronic acid and chondroitin sulphate in the treatment of corneal injuries [13]. In a study by Peng et al., MSC supernatant lyophilizate at a concentration of 50 mg/kg was administered endotracheally to mice in an acute lung injury model [12, 27].

Metabolic profiling of the stem cell secretome using MALDI-TOF-MS and other methods resulted in the identification of proteins, lipids and other metabolites [8]. Biologically active substances in cell secretions can include lipids, proteins, nucleic acids, organic acids and cell metabolites, various cytokines, chemokines, growth factors and hormones as well as extracellular vesicles including exosomes (30–150 nm) and microvesicles (100–1000 nm) [10, 16]. However, the literature shows that the secretome's antibacterial effect is mainly attributable to its protein part [16]. A study by Nakashima and colleagues using LC-MS/MS identified about 2400 different proteins in the secretome of human MSCs isolated from umbilical cord matrix, including some associated with immune and viral responses [24]. Marx et al. showed that the MSC secretome inhibited biofilm

formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through the action of proteases [21]. Some *in vitro* studies suggested that the antibacterial effect of secretome may be due to the action of chemokines, which, however, are proteins [35, 37, 38].

Some previous studies have explored non-proteomic methodologies to investigate and characterize the non-protein components of the stem cell secretome [26]. One important analysis used nucleotide-based microarrays to identify microRNAs (miRNAs). MiRNAs are an emerging group of non-coding RNAs that play a key role in the regulation of gene expression by interacting with mRNA targets [9]. There is an increasing body of evidence that supports the role of miRNA's in stem cell regeneration [25, 28, 36]. Thus, elucidating the mechanism of the antimicrobial action of the non-protein part of the stem cell secretome identified in this study requires further investigation. This may entail further innovations in bioinformatics and improvements in search algorithms to allow researchers to characterize the non-protein components of the stem cell secretome in greater detail.

As these results have shown, there may be some limitations to the use of secretome, as growth stimulation was detected in some of the strains studied, especially with high concentrations of lyophilizate. Also, some strains were found to be more sensitive (95% of the clinical strains of *Klebsiella*, for example) while in other strains, the percentage of nonresponsive strains or strains with growth stimulation was as high as 50%. This fact requires further investigation using *in vivo* animal models to rule out possible adverse effects.

Conclusion

This study demonstrated the efficacy of the non-protein part of the embryonic stem cell secretome against a wide spectrum of bacterial strains, including antibiotic-resistant ones. The lyophilized secretome showed a different effect depending on the concentration in the range of 25–100 µg/ml, but further increases in concentration showed no dose-dependent effect, and even growth stimulation was found in some strains. Clinical strains of *E. coli* and *P. aeruginosa* showed reduced bactericidal effects after one day of incubation. However, more detailed studies are needed to identify the mechanism of action of the non-protein secretome compounds and to determine the most effective dose and frequency of administration.

References

1. Andersson D.I., Balaban N.Q., Baquero F., Courvalin P., Glaser P., Gophna U., Kishony R., Molin S., Tønjum T. Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality. *FEMS Microbiol Rev.*, 2020, vol. 44, no. 2, pp. 171–188. doi: 10.1093/femsre/fuaa001
2. Arango J.C., Puerta-Arias J.D., Pino-Tamayo P.A., Arboleda-Toro D., González Á. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation alters the course of experimental paracoccidioidomycosis by exacerbating the chronic pulmonary inflammatory response. *Med. Mycol.*, 2018, vol. 56, no. 7, pp. 884–895. doi: 10.1093/mmy/myx128

3. Bahroudi M., Bakhshi B., Soudi S., Najar-Peerayeh S. Antibacterial and antibiofilm activity of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells secretome against *Vibrio cholerae*. *Microb. Pathog.*, 2020, vol. 139: 103867. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103867
4. Bari E., Ferrarotti I., Saracino L., Perteghella S., Torre M.L., Corsico A.G. Mesenchymal stromal cell secretome for severe COVID-19 infections: premises for therapeutic use. *Cells*, 2020, vol. 9, no. 4: 924. doi: 10.3390/cells9040924
5. Bukharin O.V., Brudastov Yu.A., Gritsenko V.A., Deriabin D.G. The role of bacterial ability to inactivate factors of natural anti-infective resistance in their resistance to bactericidal action (blood serum). *Bull. Exp. Biol. Med.*, 1996, vol. 121, no. 2, pp. 174–176.
6. Eleuteri S., Fierabracci A. Insights into the secretome of mesenchymal stem cells and its potential applications. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 18: 4597. doi: 10.3390/ijms20184597
7. Fernandes-Cunha G.M., Na K.S., Putra I., Lee H.J., Hull S., Cheng Y.C., Blanco I.J., Eslani M., Djalilian A.R., Myung D. Corneal wound healing effects of mesenchymal stem cell secretome delivered within a viscoelastic gel carrier. *Stem Cells Transl. Med.*, 2019, vol. 8, no. 5, pp. 478–489. doi: 10.1002/sctm.18-0178
8. Gilany K., Masroor M.J., Minai-Tehrani A., Gilany K., Masroor M.J., Minai-Tehrani A., Mani-Varnosfaderani A., Arjmand B. Metabolic profiling of the mesenchymal stem cells' secretome. In: Arjmand B. (eds) Genomics, proteomics, and metabolomics. stem cell biology and regenerative medicine. *Humana, Cham.*, 2019, pp. 67–81. doi: 10.1007/978-3-030-27727-7_3
9. Gonzalez-Rey E., Anderson P., González M.A., Rico L., Büscher D., Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*, 2009, vol. 58, no. 7, pp. 929–939. doi: 10.1136/gut.2008.168534
10. Gwam C., Mohammed N., Ma X. Stem cell secretome, regeneration, and clinical translation: a narrative review. *Ann. Transl. Med.*, 2021, vol. 9, no. 1: 70. doi: 10.21037/atm-20-5030
11. Johnson V., Webb T., Norman A., Coy J., Kurihara J., Regan D., Dow S. Activated mesenchymal stem cells interact with antibiotics and host innate immune responses to control chronic bacterial infections. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1: 9575. doi: 10.1038/s41598-017-08311-4
12. Khatri M., Richardson L.A., Meulia T. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate influenza virus-induced acute lung injury in a pig model. *Stem Cell Res. Ther.*, 2018, vol. 9, no. 1: 17. doi: 10.1186/s13287-018-0774-8
13. Krasnodembskaya A., Song Y., Fang X., Gupta N., Serikov V., Lee J.W., Matthay M.A. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part by secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells*, 2010, vol. 28, no. 12, pp. 2229–2238. doi: 10.1002/stem.544
14. Legaki E., Roubelakis M.G., Theodoropoulos G.E., Lazaris A., Kollia A., Karamanolis G., Marinos E., Gazouli M. Therapeutic potential of secreted molecules derived from human amniotic fluid mesenchymal stem/stroma cells in a mice model of colitis. *Stem Cell Rev. Rep.*, 2016, vol. 12, no. 5, pp. 604–612. doi: 10.1007/s12015-016-9677-1
15. Liesveld J.L., Sharma N., Aljittawi O.S. Stem cell homing: from physiology to therapeutics. *Stem Cells*, 2020, vol. 38, no. 10, pp. 1241–1253. doi: 10.1002/stem.3242
16. Lobov A.A., Yudincheva N.M., Mittenberg A.G., Shabelnikov S.V., Mikhailova N.A., Malashicheva A.B., Khotin M.G. Proteomic profiling of the human fetal multipotent mesenchymal stromal cells secretome. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 22: 5283. doi: 10.3390/molecules25225283
17. Lopatkin A.J., Bening S.C., Manson A.L., Stokes J.M., Kohanski M.A., Badran A.H., Earl A.M., Cheney N.J., Yang J.H., Collins J.J. Clinically relevant mutations in core metabolic genes confer antibiotic resistance. *Science*, 2021, vol. 371, no. 6531: eaba0862. doi: 10.1126/science.aba0862
18. Madrigal M., Rao K.S., Riordan N.H. A review of the therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J. Transl. Med.*, 2014, vol. 12: 260. doi: 10.1186/s12967-014-0260-8
19. Maguire G. Stem cell therapy without the cells. *Commun. Integr. Biol.*, 2013, vol. 6, no. 6: 260.e26631. doi: 10.4161/cib.26631
20. Marchant J. When antibiotics turn toxic. *Nature*, 2018, vol. 555, no. 7697, pp. 431–433. doi: 10.1038/d41586-018-03267-5
21. Marx C., Gardner S., Harman R.M., Van de Walle G.R. The mesenchymal stromal cell secretome impairs methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms via cysteine protease activity in the equine model. *Stem Cells Transl. Med.*, 2020, vol. 9, no. 7, pp. 746–757. doi: 10.1002/sctm.19-0333
22. Mita T., Furukawa-Hibi Y., Takeuchi H., Hattori H., Yamada K., Hibi H., Ueda M., Yamamoto A. Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.*, 2015, vol. 293, pp. 189–197. doi: 10.1016/j.bbr.2015.07.043
23. Moraes C.N., Maia L., de Oliveira E., de Paula Freitas Dell'Aqua C., Chapwanya A., da Cruz Landim-Alvarenga F., Oba E. Shotgun proteomic analysis of the secretome of bovine endometrial mesenchymal progenitor/stem cells challenged or not with bacterial lipopolysaccharide. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2017, vol. 187, pp. 42–47. doi: 10.1016/j.vetimm.2017.03.007
24. Nakashima Y., Nahar S., Miyagi-Shiohira C., Kinjo T., Toyoda Z., Kobayashi N., Saitoh I., Watanabe M., Fujita J., Noguchi H. A liquid chromatography with tandem mass spectrometry-based proteomic analysis of the proteins secreted by human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.*, 2018, vol. 27, no. 10, pp. 1469–1494. doi: 10.1177/0963689718795096
25. Nakamura Y., Miyaki S., Ishitobi H., Matsuyama S., Nakasa T., Kamei N., Akimoto T., Higashi Y., Ochi M. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *FEBS Lett.*, 2015, vol. 589, no. 11, pp. 1257–1265. doi: 10.1016/j.febslet.2015.03.031
26. Park B.S., Kim W.S., Choi J.S., Kim H.K., Won J.H., Ohkubo F., Fukuoka H. Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. *Biomed. Res.*, 2010, vol. 31, no. 1, pp. 27–34. doi: 10.2220/biomedres.31.27
27. Peng W., Chang M., Wu Y., Zhu W., Tong L., Zhang G., Wang Q., Liu J., Zhu X., Cheng T., Li Y., Chen X., Weng D., Liu S., Zhang H., Su Y., Zhou J., Li H., Song Y. Lyophilized powder of mesenchymal stem cell supernatant attenuates acute lung injury through the IL-6-p-STAT3-p63-JAG2 pathway. *Stem Cell Res. Ther.*, 2021, vol. 12, no. 1: 216. doi: 10.1186/s13287-021-02276-y
28. Qin Y., Wang L., Gao Z., Chen G., Zhang C. Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in vivo. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6: 21961. doi: 10.1038/srep21961
29. Riduan S.N., Armugam A., Zhang Y. Antibiotic resistance mitigation: the development of alternative general strategies. *J. Mater. Chem. B*, 2020, vol. 8, no. 30, pp. 6317–6321. doi: 10.1039/D0TB01241F

30. Russell K.A., Garbin L.C., Wong J.M., Koch T.G. Mesenchymal stromal cells as potential antimicrobial for veterinary use – a comprehensive review. *Front. Microbiol.*, 2020, vol. 11: 606404. doi: 10.3389/fmicb.2020.606404
31. Saberpour M., Bakhshi B., Najari-Peerayeh S. Evaluation of the antimicrobial and antibiofilm effect of chitosan nanoparticles as carrier for supernatant of mesenchymal stem cells on multidrug-resistant *Vibrio cholerae*. *Infect. Drug Resist.*, 2020, vol. 13, pp. 2251–2260. doi: 10.2147/IDR.S244990
32. Spekker K., Leineweber M., Degrandi D., Ince V., Brunder S., Schmidt S.K., Stuhlsatz S., Howard J.C., Schares G., Degistirici O., Meisel R., Sorg R.V., Seissler J., Hemphill A., Pfeffer K., Däubener W. Antimicrobial effects of murine mesenchymal stromal cells directed against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: role of immunity-related GTPases (IRGs) and guanylate-binding proteins (GBPs). *Med. Microbiol. Immunol.*, 2013, vol. 202, no. 3, pp. 197–206. doi: 10.1007/s00430-012-0281-y
33. Tao H., Chen X., Wei A., Song X., Wang W., Liang L., Zhao Q., Han Z., Han Z., Wang X., Li Z. Comparison of teratoma formation between embryonic stem cells and parthenogenetic embryonic stem cells by molecular imaging. *Stem Cells Int.*, 2018, vol. 2018: 7906531. doi: 10.1155/2018/7906531
34. Timmers L., Lim S.K., Arslan F., Armstrong J.S., Hoefer I.E., Doevendans P.A., Piek J.J., El Oakley R.M., Choo A., Lee C.N., Pasterkamp G., de Kleijn D.P. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res.*, 2007, vol. 1, no. 2, pp. 129–137. doi: 10.1016/j.scr.2008.02.002
35. Vizoso F.J., Eiro N., Cid S., Schneider J., Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 9: 1852. doi: 10.3390/ijms18091852
36. Xin H., Li Y., Cui Y., Yang J.J., Zhang Z.G., Chopp M. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2013, vol. 33, no. 11, pp. 1711–1715. doi: 10.1038/jcbfm.2013.152
37. Yagi H., Chen A.F., Hirsch D., Rothenberg A.C., Tan J., Alexander P.G., Tuan R.S. Antimicrobial activity of mesenchymal stem cells against *Staphylococcus aureus*. *Stem Cell Res. Ther.*, 2020, vol. 11, no. 1: 293. doi: 10.1186/s13287-020-01807-3
38. Yang D., Chen Q., Hoover D.M., Staley P., Tucker K.D., Lubkowski J., Oppenheim J.J. Many chemokines including CCL20/MIP-3 α display antimicrobial activity. *J. Leukoc. Biol.*, 2003, vol. 74, no. 3, pp. 448–455. doi: 10.1189/jlb.0103024
39. Yang R., Liu Y., Kelk P., Qu C., Akiyama K., Chen C., Atsuta I., Chen W., Zhou Y., Shi S. A subset of IL-17⁺ mesenchymal stem cells possesses anti-*Candida albicans* effect. *Cell Res.*, 2013, vol. 23, no. 1, pp. 107–121. doi: 10.1038/cr.2012.179
40. Zullo J., Matsumoto K., Xavier S., Ratliff B., Goligorsky M.S. The cell secretome, a mediator of cell-to-cell communication. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 2015, vol. 120, pp. 17–20. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2015.03.012

Авторы:

Кайгородов Д.Г., директор ООО НИИ Биотехнологии «Митокей», г. Тюмень, Россия;
Кайгородова А.Д., студентка ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия.

Authors:

Kaigorodov D.G., Director, LLC Institute for Scientific Research Biotechnologies “Mitokey”, Tyumen, Russian Federation;
Kaigorodova A.D., Student, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.05.2022
Принята к печати 19.06.2022

Received 04.05.2022
Accepted 19.06.2022

ВЛИЯНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ *ASPERGILLUS FUMIGATUS* НА РЕГУЛЯЦИЮ ИММУННОГО ОТВЕТА БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Я.И. Козлова¹, Е.В. Фролова¹, И.В. Кудрявцев^{2,3}, А.Е. Учеваткина¹, Л.В. Филиппова¹, О.В. Аак¹, А.Е. Тараскина¹, А.В. Соболев¹, Н.В. Васильева¹, Н.Н. Климко¹

¹ ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербурга, Россия

³ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербурга, Россия

Резюме. Введение. Благодаря мелким размерам спор и термотолерантности, *Aspergillus fumigatus*, способны не только сенсибилизировать больных с атопией, но и колонизировать дыхательные пути, оставаясь постоянным источником аллергенов. В настоящее время роль микроскопических плесневых грибов в иммунопатогенезе бронхиальной астмы изучена недостаточно. Цель: оценить особенности регуляции иммунного ответа больных аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (АБЛА) и бронхиальной астмой (БА) с сенсибилизацией к *A. fumigatus*. **Материалы и методы.** В исследование включили 15 больных АБЛА, 10 больных БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus*, 16 больных БА без сенсибилизации к *A. fumigatus*. Группу контроля составили 16 условно здоровых добровольцев. Всем больным проводили клинико-функциональное обследование. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови определяли методом проточной цитометрии. Для оценки продукции IFN γ , IL-10 и IL-13 к образцам периферической крови добавляли аллерген *A. fumigatus*. Иммуноферментным методом определяли содержание цитокинов в супернатантах клеточных культур, а также уровни общего IgE, специфических IgE (sIgE) к *A. fumigatus*, тимус-ассоциированного регуляторного хемокина (TARC) в сыворотке крови. **Результаты.** У больных АБЛА и БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus* по сравнению с больными БА без сенсибилизации к *A. fumigatus* установлены значимо более высокие уровни общего IgE, sIgE к *A. fumigatus* и TARC в сыворотке крови. Анализ результатов иммунофенотипирования лимфоцитов выявил у всех больных БА значимое превышение показателей Th2 клеток памяти и T-регуляторных клеток по сравнению с группой контроля. У больных с сенсибилизацией к *A. fumigatus* количество Tfh2 было выше, а Th17.1 клеток памяти ниже по сравнению с показателями условно здоровых добровольцев. У больных АБЛА установлены значимо более высокое количество Th2 клеток памяти и содержание TARC по сравнению с больными БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus*. Усиление активности Th2 клеток памяти подтверждает повышенная секреция IL-13 и IL-10 на фоне снижения выработки IFN γ в ответ на специфическую стимуляцию клеток крови аллергеном гриба по сравнению с больными БА и группой контроля. Выявлена положительная корреляционная связь между количеством Th2 клеток памяти и уровнями sIgE, IgE, TARC и отрицательная с ОФВ1. **Заключение.** Таким образом, контакт с *A. fumigatus* существенно усиливает активность Th2 клеток па-

Адрес для переписки:

Козлова Яна Игоревна
194291, Россия, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28,
НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина.
Тел.: 8 (812) 303-51-40. Факс: 8 (812) 510-62-77.
E-mail: kozlova510@mail.ru

Contacts:

Yana I. Kozlova
194291, Russian Federation, St. Petersburg, Santiago-de-Cuba str., 1/28,
P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology.
Phone: +7 (812) 303-51-40. Fax: +7 (812) 510-62-77.
E-mail: kozlova510@mail.ru

Для цитирования:

Козлова Я.И., Фролова Е.В., Кудрявцев И.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Аак О.В., Тараскина А.Е., Соболев А.В., Васильева Н.В., Климко Н.Н. Влияние микроскопических грибов *Aspergillus fumigatus* на регуляцию иммунного ответа больных бронхиальной астмой // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1069–1080. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1986

Citation:

Kozlova Ya.I., Frolova E.V., Kudryavtsev I.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Aak O.V., Taraskina A.E., Sobolev A.V., Vasilyeva N.V., Klimko N.N. The influence of *Aspergillus fumigatus* micromycetes on immune response regulation in patients with asthma // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1069–1080. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1986

мнати у больных БА, что может приводить к тяжелому течению заболевания и формированию аллергического бронхолегочного аспергиллеза. Установленные особенности иммунного ответа диктуют необходимость персонализированного подхода к выбору терапевтической тактики у данной категории больных.

Ключевые слова: аллергический бронхолегочный аспергиллез, бронхиальная астма, Т-хелперы клетки памяти, хемокины, иммунный ответ, *Aspergillus fumigatus*.

THE INFLUENCE OF *ASPERGILLUS FUMIGATUS* MICROMYCETES ON IMMUNE RESPONSE REGULATION IN PATIENTS WITH ASTHMA

Kozlova Ya.I.^a, Frolova E.V.^a, Kudryavtsev I.V.^{b,c}, Uchevatkina A.E.^a, Filippova L.V.^a, Aak O.V.^a, Taraskina A.E.^a, Sobolev A.V.^a, Vasilyeva N.V.^a, Klimko N.N.^a

^a North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation

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

^c Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* *Aspergillus fumigatus* is able not only to sensitize patients with atopy, but also to colonize the respiratory tract, remaining a constant source of allergens due to the small spore size and thermal tolerance. Currently, the role of micromycetes in the immunopathogenesis of asthma has been poorly studied. The objective was to evaluate the features of the immune response regulation in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) or asthma with sensitization to *A. fumigatus*. *Materials and methods.* There were enrolled 15 patients with ABPA, 10 patients with asthma with sensitization to *A. fumigatus*, 16 patients with asthma without sensitization to *A. fumigatus*. The control group consisted of 16 apparently healthy volunteers. All patients underwent a clinical and functional examination. The subpopulations of blood lymphocytes were assessed by flow cytometry. The *A. fumigatus* allergen was added to peripheral blood samples to evaluate the production of IFN γ , IL-10 and IL-13. The serum cytokine levels in cell culture supernatants, as well as total IgE, *A. fumigatus*-specific IgE (sIgE) as well as thymus and activation-regulated chemokine (TARC) level were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. *Results.* Significantly higher serum levels of total IgE, *A. fumigatus*-specific sIgE and TARC were found in patients with ABPA and asthma with sensitization to *A. fumigatus* compared to patients with asthma without sensitization to *A. fumigatus*. The results of lymphocyte immunophenotyping revealed significant excess of memory Th2 cells and T-regulatory cells in all patients with asthma compared to the control group. The count of Tfh2 was higher but memory Th17.1 cells were lower in patients with sensitization to *A. fumigatus* compared to those of apparently healthy volunteers. Patients with ABPA had significantly higher count of memory Th2 cells and TARC level compared to patients with asthma sensitized to *A. fumigatus*. The increased activity of memory Th2 cells is confirmed by increased secretion of IL-13 and IL-10 following along with decreased IFN γ production in response to specific fungal allergen stimulation of blood cells compared to the patients with asthma and the control group. A positive correlation was revealed between the count of memory Th2 cells and the levels of sIgE, IgE, TARC, a negative correlation — with FEV1. *Conclusion.* Thus, exposure to *A. fumigatus* significantly enhances the activity of memory Th2 cells in patients with asthma which can lead to severe disease course and development of allergic bronchopulmonary aspergillosis. The features of the immune response identified dictate a need for a personalized approach to choose therapeutic tactics in such patients.

Key words: allergic bronchopulmonary aspergillosis, asthma, memory T-helper cells, chemokines, immune response, *Aspergillus fumigatus*.

Введение

Микроскопические грибы, имеющие широкое распространение в окружающей среде, являются представителями отдельного царства живых существ, для которых характерно разнообразное влияние на организм человека. Особое внимание уделяют плесневым термотолерантным микромицетам, способным жить при температуре +37°C, таким как *A. fumigatus* [23]. Грибы рода *Aspergillus* — наиболее значимые микромицеты, которые поражают дыхательные пути. При неэффективном удалении из респираторного тракта грибковые конидии могут прорасти, образуя гифы, которые, в свою очередь, запускают каскад иммунных реакций, приводящих к широкому спектру клинических прояв-

лений — от колонизации до инвазивного аспергиллеза. У больных с хроническими полостями в легких *A. fumigatus* может стать этиологическим агентом хронического аспергиллеза легких, а у больных с атопией — участвовать в развитии микогенной сенсибилизации и аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА) [31].

Аллергический бронхолегочный аспергиллез — хроническое заболевание легких, обусловленное гиперчувствительностью к грибам рода *Aspergillus*, которое является наиболее значимым проявлением аллергического аспергиллеза и встречается во всем мире. Это потенциально деструктивное заболевание на сегодняшний день недооценено клиницистами. Чаще всего АБЛА развивается у предрасположенных пациентов с бронхиальной астмой (БА) и му-

ковисцидозом, утяжеляя течение основного заболевания, приводя к развитию бронхоэктазов и дыхательной недостаточности [12, 14].

В то время как многочисленные современные исследования посвящены патогенетическим механизмам, лежащими в основе тяжелой БА, работ по оценке иммунного ответа при развитии БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus* и АБЛА недостаточно [10, 18]. Исследования нарушений местных и системных иммунорегуляторных механизмов, приводящих к гиперпродукции слизи, закупорке дыхательных путей и формированию бронхоэктазов, будут способствовать выявлению АБЛА на более ранних этапах и разработке новых терапевтических стратегий. Поэтому целью исследования стала оценка особенностей регуляции иммунного ответа больных АБЛА и БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus*.

Материалы и методы

В микологической клинике ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России провели проспективное исследование, в которое включили 41 больного БА. Контрольную группу составили 16 условно здоровых людей, сопоставимых по возрасту и полу, без аллергических заболеваний в анамнезе.

Все участники подписали добровольное информированное согласие на проведение исследования. Протокол обследования пациентов и практически здоровых людей отвечал этическим нормам Хельсинкской декларации и был одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университета имени И.И. Мечникова» МЗ РФ (Протокол № 2 от 03.02.2021). Все пациенты соответствовали общим критериям включения в исследование: диагноз «БА», тяжелое/среднетяжелое течение заболевания, возраст 18 лет и старше, отсутствие острых респираторных заболеваний в течение предшествующих 4 недель. Критериями включения в контрольную группу были: отсутствие респираторной патологии, хронической инфекционной и неинфекционной патологии, гельминтной инвазии, декомпенсированных состояний, отрицательный аллергологический анамнез, неотягощенная по БА и другим аллергическим заболеваниям наследственность.

Уровни общего IgE (Полигност, Россия), специфических IgE (sIgE) (Алкор Био, Россия), тимус-ассоциированного регуляторного хемокина (thymus and activation regulated chemokine, TARC) (R&D, США) в сыворотке крови определяли с помощью иммуноферментных тест-систем в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Клинический анализ крови выполняли на гематологическом анализаторе DxH-800 (Beckman Coulter, США). Иммунофенотипирование лим-

фоцитов периферической крови было проведено методом 6-цветного цитофлуориметрического анализа с использованием проточного цитометра Navios™ (Beckman Coulter, США). Подготовку образцов периферической крови и настройку цитофлуориметра проводили в соответствии с национальными рекомендациями [8]. Субпопуляцию Т-хелперов (Th) клеток памяти выделяли по фенотипу CD4⁺CD45RA⁻ и анализировали уровень экспрессии на них следующих хемокиновых рецепторов: CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5. Окраску антителами проводили в соответствии с рекомендациями производителей. В работе использовали моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами: CD4/PerCP, CD45RA/PE/Cy7, CD183(CXCR3)/AlexaFluor488, CD194(CCR4)/PE, CD196(CCR6)/PE-Dazzle™594 и CD185(CXCR5)/Alexa Fluor 647 (Biolegend, США). После внесения антител образцы тщательно перемешивали, затем инкубировали при комнатной температуре 15 мин в защищенном от света месте. По завершении инкубации вносили 500 мкл лизирующего раствора VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter, США) с добавлением фиксирующего раствора Fixative Solution IOTest 3 (12,5 мкл) (Beckman Coulter, США). Через 10 мин инкубации при комнатной температуре в темноте образцы отмывали в 4 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) 5 мин при 1500 об/мин, удаляли надосадок и восстанавливали лейкоцитарную взвесь в 400 мкл ФСБ. При цитометрическом анализе для каждого из образцов набирали не менее 5000 лимфоцитов. Полученные результаты анализировали при помощи программного обеспечения Navios™ Software v1.2 (Beckman Coulter, США) и выражали в виде процента позитивных клеток от искомой популяции. Оценку Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) проводили методом проточной цитометрии при окрашивании лимфоцитов периферической крови моноклональными антителами CD4/FITC, CD127/PC7 и CD25/PE (Beckman Coulter, США). Подготовку проб осуществляли в тех же условиях, что и при 6-цветном анализе.

С целью изучения антиген-специфической продукции IFN γ , IL-10 и IL-13 к 100 мкл разведенной в 5 раз крови добавляли 100 мкл аллергена *A. fumigatus* (Алкор Био, Россия) в конечной концентрации 10 мкг/мл. Для разведения крови и аллергена использовали полную питательную среду (ППС): среда RPMI 1640 с добавлением L-глутамин (Биолот, Россия), 200 мкг/мл гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия). В предварительных экспериментах были определены оптимальная доза аллергена и сроки культивирования клеток. Для спонтанной продукции цитокинов в лунки 96-луночного планшета вносились по 100 мкл ППС. Через 144 ч инкубации образцов при

37°C в атмосфере 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе (МСО-5А Sanyo™, Япония) отбирали надосадочную жидкость, аликвотировали и хранили при –20°C до проведения анализа. Содержание цитокинов в полученных образцах определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем (Вектор-Бест, Россия и R&D, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Для изучения функции внешнего дыхания использовали спирометрию методом выполнения петли «объем–поток» с компьютерной обработкой результатов исследования. Учитывали следующие показатели: объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), индекс Тиффно. По показаниям выполняли компьютерную томографию (КТ) легких в режиме высокого разрешения.

Диагноз, степень тяжести и уровень контроля над течением БА устанавливали в соответствии с рекомендациями рабочей группы GINA (Global Initiative for Asthma, updated, 2022) [28]. При оценке контроля над симптомами БА ориентировались на жалобы, клинические проявления, данные спирометрии с проведением теста на обратимость. Также использовали опросник АСТ (Asthma Control Test), который является краткой и доступной анкетой, содержит 5 вопросов с 5-балльной оценкой ответов. Сумма 25 баллов означают полный контроль БА, 20–24 — неполный контроль, 19 баллов и меньше — указывает на отсутствие контроля. С помощью АСТ оценивали уровень контроля БА за последние 4 недели.

Для выявления микогенной сенсибилизации и аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА) использовали рекомендации рабочей

группы ISHAM (International Society for Human and Animal Mycology, 2013). Критериями микогенной сенсибилизации были: положительный кожный прик-тест (≥ 3 мм) и/или выявление в сыворотке крови уровня специфического IgE к грибковому аллергену, соответствующего классу 1 и выше ($\geq 0,35$ МЕ/мл) [9].

Полученные в процессе исследования данные обрабатывали с помощью программной системы Statistica 10 (StatSoft, США). Нормальность распределения количественных данных проверяли с помощью критерия Колмогоров–Смирнова и Шапиро–Уилка. Изучаемые характеристики представляли медианами, нижним и верхним квартилями (Me (Q_{0,25}; Q_{0,75})). Для оценки значимости различий использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для выявления корреляционных взаимосвязей между двумя количественными параметрами использовали непараметрический метод ранговой корреляции по Спирмену с вычислением коэффициента ранговой корреляции (r). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На основании результатов клинко-инструментального обследования больные БА были разделены на три группы: 16 больных БА без сенсибилизации к *A. fumigatus* (БА Asp–) (женщин — 80,7%), 10 больных БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus* (БА Asp+) (женщин — 77,8%), 15 больных, у которых на фоне БА сформировался АБЛА (женщин — 80,2%). Контрольную группу составили 16 здоровых добровольцев (женщин — 75,0%). Группы не различались между собой по возрасту и полу (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика больных бронхиальной астмой, Me (Q_{0,25}–Q_{0,75})

Table 1. Characteristics of patients with bronchial asthma, Me (Q_{0,25}–Q_{0,75})

Показатель Parameters	Группа 1 Group 1 n = 16	Группа 2 Group 2 n = 16	Группа 3 Group 3 n = 10	Группа 4 Group 4 n = 15	Достоверно значимые различия p value
	Контрольная группа Control group	БА без сенсибилизации к <i>A. fumigatus</i> BA without sensitization to <i>A. fumigatus</i>	БА с сенсибилизацией к <i>A. fumigatus</i> BA with sensitization to <i>A. fumigatus</i>	АБЛА ABPA	
Возраст, лет Age, years	41,0 (39,0–44,5)	50,0 (37,0–56,5)	46,0 (35,0–66,0)	49,0 (41,0–64,0)	
ОФВ1, % от должного FEV1, %	–	81,0 (67,0–91,1)	64,0 (56,5–81,5)	65,0 (60,0–70,0)	p ₂₋₃ = 0,005 p ₂₋₄ = 0,015
АСТ, баллы ACT, score	–	15,0 (10,0–19,0)	13,5 (10,5–20,0)	13,0 (12,0–14,0)	

Примечание. p₂₋₃ — статистическая значимость различий между группами БА без сенсибилизации к *A. fumigatus* и БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus*; p₂₋₄ — статистическая значимость различий между группами БА без сенсибилизации к *A. fumigatus* и АБЛА (U-критерий Манна–Уитни).

Note. p₂₋₃ — statistical significance of differences between BA without and with sensitization to *A. fumigatus*; p₂₋₄ — statistical significance of differences between BA without sensitization to *A. fumigatus* and ABPA groups (Mann–Whitney U-test).

Анализ спирометрических характеристик выявил, что показатель ОФВ1 в группах больных АБЛА и БА Asp+ был значимо ниже, чем у больных БА Asp– (65,0% (60,0–70,0) и 64,0% (56,5–81,5) vs 81,0% (67,0–91,1), $p = 0,015$ и $p = 0,005$ соответственно), что может быть связано с более выраженным воспалением стенки бронхов, и утяжелением течения БА при сочетании с сенсibilизацией к *A. fumigatus*. Статистически значимых различий по результатам заполнения опросника АСТ у больных исследуемых групп не установлено. Однако выявлена тенденция к снижению среднего балла по мере возрастания показателей, отражающих степень сенсibilизации к *A. fumigatus* (табл. 1).

Во всех исследуемых группах больных установлено статистически значимое повышение уровня общего IgE по сравнению с группой контроля ($p \leq 0,001$). Содержание общего IgE у больных АБЛА составило 2332,5 МЕ/мл (1147,0–4530,0) и было значимо выше, чем в группах больных БА Asp+ (659,0 МЕ/мл (300,0–700,0, $p < 0,001$) и БА Asp– (159,0 МЕ/мл (72,0–441,0), $p < 0,001$). Кроме того, данный показатель был значимо выше у больных БА Asp+ по сравнению с пациентами БА Asp– ($p = 0,012$) (рис., А). Уровни sIgE

к *A. fumigatus* различались между больными АБЛА и БА Asp+ (2,23 МЕ/мл (1,10–4,14) vs 0,72 МЕ/мл (0,50–1,60), $p = 0,019$) и значимо превышали показатели пациентов с БА Asp– (0,00 МЕ/мл (0,00–0,02), $p < 0,001$ и $p < 0,001$ соответственно) (рис., В).

Известно, что эозинофилы крови могут быть маркером эозинофильного воспаления в дыхательных путях у пациентов с БА, а эозинофилия является признанным прогностическим фактором обострения заболевания. Абсолютное число эозинофилов в группе больных АБЛА составило $0,41 \times 10^9/\text{л}$ (0,37–0,75) и было значимо выше по сравнению с показателями пациентов с БА Asp– ($0,30 \times 10^9/\text{л}$ (0,07–0,43), $p = 0,023$) и контрольной группы ($0,09 \times 10^9/\text{л}$ (0,06–0,20), $p < 0,001$). Показатели в группах больных БА Asp+ и БА Asp– не различались между собой ($p = 0,36$) (рис., В).

Учитывая данные о патогенетических механизмах взаимодействия *A. fumigatus* с эпителиальными клетками дыхательных путей больных БА, в нашем исследовании был определен уровень TARC, который участвует в детерминации иммунного ответа в сторону Т2-звена [16]. Установлено существенное повышение показателей TARC во всех группах по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$). Выявлены значимые

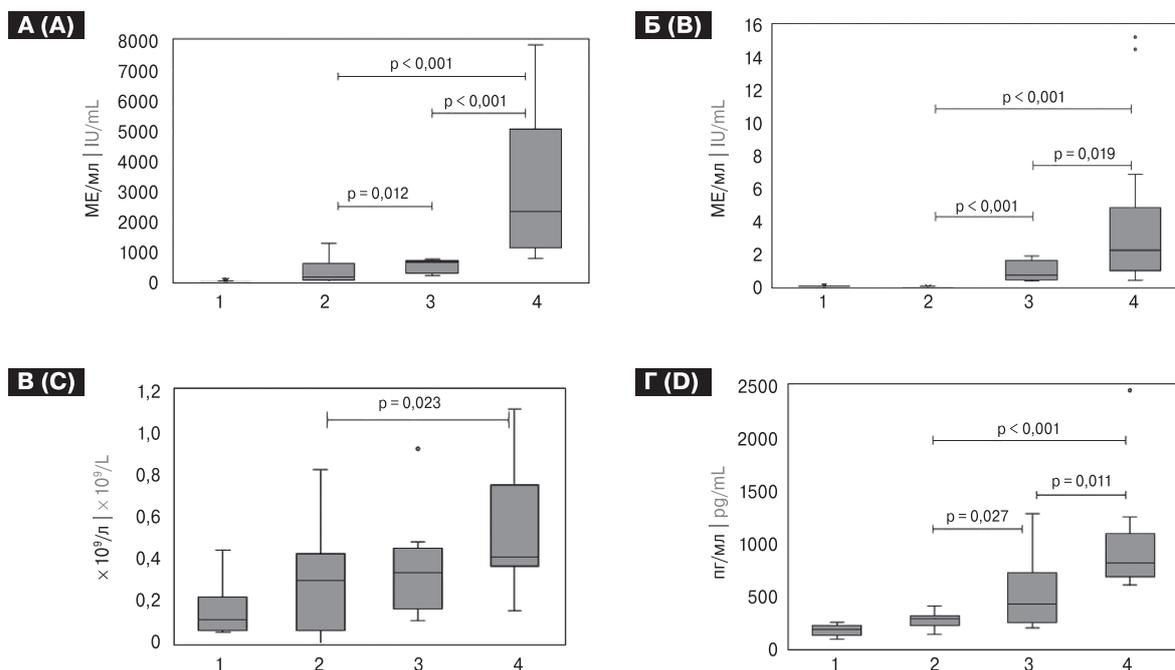


Рисунок. Уровни общего IgE, sIgE, TARC и количество эозинофилов в крови у больных бронхиальной астмой, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Figure. Serum levels of total IgE, sIgE, TARC and blood eosinophil count in patients with bronchial asthma, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Примечание. Показатели общего IgE (МЕ/мл) (А), sIgE (МЕ/мл) (Б), количества эозинофилов в крови ($\times 10^9/\text{л}$) (В), TARC (пг/мл) (Г) у здоровых людей (группа 1), больных БА без сенсibilизации к *A. fumigatus* (группа 2), больных БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus* (группа 3) и АБЛА (группа 4). p — достоверность различий между группами (U-критерий Манна–Уитни).

Note. Serum level of total IgE (IU/ml) (A), sIgE (IU/ml) (B), count of blood eosinophils ($\times 10^9/\text{L}$) (C), TARC (pg/ml) (D) in healthy subjects (group 1), BA patients without sensitization to *A. fumigatus* (group 2), BA patients with sensitization to *A. fumigatus* (group 3) and ABLA (group 4). p — significant differences between groups (Mann–Whitney U-test).

Таблица 2. Относительное содержание субпопуляций Т-хелперов среди клеток с фенотипом CD45RA⁻ у больных бронхиальной астмой, Me (Q_{0,25}–Q_{0,75})
 Table 2. Percentage of T-helper subpopulations out of CD45RA⁻ cells in patients with bronchial asthma, Me (Q_{0,25}–Q_{0,75})

Популяции Т-хелперов T-helper cell subsets	Содержание клеток/Cell count				Достоверно значимые различия p value
	Группа 1 Group 1 n=16	Группа 2 Group 2 n=16	Группа 3 Group 3 n=10	Группа 4 Group 4 n=15	
Контрольная группа Control group			БА с сенсibilизацией к <i>A. fumigatus</i> BA with sensitization to <i>A. fumigatus</i>	АБЛА ABPA	
Th (CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	46,0 (42,5–49,5)	49,5 (43,0–58,0)	50,0 (45,0–54,0)	48,0 (43,0–55,0)	
Th (CD45RA ⁻ CD4 ⁺), %	41,75 (37,75–52,75)	53,10 (47,70–60,90)	54,30 (44,50–61,20)	49,10 (44,20–65,00)	P ₁₋₂ = 0,012 P ₁₋₃ = 0,013 P ₁₋₄ = 0,012
Th1 (CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁺), %	8,35 (6,95–11,90)	9,00 (7,15–12,15)	11,90 (7,30–18,00)	8,50 (5,60–9,00)	
Th17 (CXCR5 ⁻ CCR6 ⁺ CCR4 ⁺), %	13,35 (12,35–14,90)	14,45 (11,60–17,20)	12,45 (9,70–15,70)	13,70 (12,60–15,60)	
Th2 (CXCR5 ⁻ CCR4 ⁺), %	5,65 (4,30–6,30)	8,05 (5,75–10,10)	8,35 (7,40–9,80)	11,10 (8,80–13,00)	P ₁₋₂ = 0,006 P ₁₋₃ < 0,001 P ₁₋₄ < 0,001 P ₂₋₄ = 0,017 P ₃₋₄ = 0,035
Th17.1 (CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺), %	14,75 (12,65–18,20)	14,65 (9,20–18,35)	8,95 (7,40–10,90)	11,10 (9,92–14,50)	P ₁₋₃ = 0,001 P ₁₋₄ = 0,016
Tfh1 (CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺), %	3,05 (2,45–4,30)	2,55 (1,60–3,10)	3,45 (2,60–3,90)	3,10 (2,10–3,50)	P ₁₋₂ = 0,040 P ₂₋₃ = 0,031
Tfh2 (CXCR5 ⁺ CCR4 ⁺), %	1,95 (1,55–2,65)	1,80 (1,60–2,85)	3,15 (1,80–4,30)	2,81 (2,00–3,70)	P ₁₋₃ = 0,049 P ₁₋₄ = 0,011 P ₂₋₄ = 0,021
Tfh17 (CXCR5 ⁺ CCR6 ⁺), %	1,45 (1,10–2,00)	1,55 (1,20–2,00)	2,15 (1,80–2,70)	1,50 (0,70–2,40)	P ₁₋₃ = 0,042
Tfh17.1 (CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺), %	1,40 (1,10–2,10)	1,40 (1,10–2,00)	1,45 (1,30–1,80)	1,90 (1,40–2,20)	

Примечание. P₁₋₂ — статистическая значимость различий между группами БА без сенсibilизации к *A. fumigatus* и контроле; P₁₋₃ — статистическая значимость различий между группами БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus* и контроле; P₁₋₄ — статистическая значимость различий между группами АБЛА и контроле; P₂₋₃ — статистическая значимость различий между группами БА без сенсibilизации к *A. fumigatus* и БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus*; P₂₋₄ — статистическая значимость различий между группами АБЛА и БА без сенсibilизации к *A. fumigatus*; P₃₋₄ — статистическая значимость различий между группами БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus* и АБЛА (U-критерий Манна-Уитни).

Note. P₁₋₂ — statistical significance of differences between BA without sensitization to *A. fumigatus* and control groups; P₁₋₃ — statistical significance of differences between BA with sensitization to *A. fumigatus* and control groups; P₁₋₄ — statistical significance of differences between ABPA and control groups; P₂₋₃ — statistical significance of differences between BA without vs with sensitization to *A. fumigatus*; P₂₋₄ — statistical significance of differences between BA without sensitization to *A. fumigatus* and ABPA groups; P₃₋₄ — statistical significance of differences between BA with sensitization to *A. fumigatus* and ABPA groups (Mann-Whitney U-test).

различия содержания данного хемокина у больных АБЛА — 811,0 пг/мл (686,5–1039,0) по сравнению с группой БА Asp+ (425,0 пг/мл (295,0–625,0), $p = 0,011$) и БА Asp– (287,0 пг/мл (238,5–310,0), $p < 0,001$). Кроме того уровень TARC был значимо выше у больных БА Asp+ по отношению к пациентам БА Asp– ($p = 0,027$) (рис., Г).

Важная роль TARC в прогрессировании аллергического воспаления у больных с микогенной сенсibilизацией подтверждена положительной корреляционной связью TARC с уровнем sIgE к *A. fumigatus* ($r = 0,776$, $p < 0,001$), общего IgE ($r = 0,823$, $p < 0,001$) и отрицательной с ОФВ1 ($r = -0,552$, $p < 0,001$).

Большое количество современных исследований посвящены иммунологическим изменениям, которые лежат в основе патогенеза различных фенотипов тяжелой БА [1, 2, 3, 7, 19]. Однако работы направленные на определение различных клонов Т-хелперов у больных с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. немногочисленны [10, 18]. В ходе нашего исследования мы определяли субпопуляционный состав лимфоцитов крови у пациентов с БА в зависимости от наличия сенсibilизации к *A. fumigatus* и развития АБЛА. Данные представлены в табл. 2. Значимых различий по количеству CD4⁺ Т-хелперов между группами больных и группой контроля установлено не было. Пациенты всех групп имели достоверно более высокий процент CD4⁺CD45RA⁻ Т-клеток памяти по сравнению с показателем группы контроля, что согласуется с результатами других авторов [11, 32].

Установлено, что анализ экспрессии хемокиновых рецепторов позволяет судить не только о направлении миграции CD4⁺ Т-хелперов из кровотока, но может выступать и в качестве одного из методических приемов для определения поляризации клеток в сторону того или иного клона [6]. В нашем исследовании все CD4⁺CD45RA⁻ Т-клетки памяти были разделены на CXCR5-негативные и CXCR5-позитивные. Среди CXCR5-негативных CD4⁺CD45RA⁻ Т-хелперов памяти были выявлены следующие Th с различными фенотипами: Th1 (CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻), Th2 (CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁺), «классические» Th17 (CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺) и «неклассические» Th17.1 (CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻).

Анализ субпопуляционного состава Т-клеток памяти не выявил достоверных различий по числу Th1 и «классических» Th17 между группами, включенными в исследование (табл. 2). Установлено, что у всех групп больных БА в периферической крови относительное количество Th2 значимо превышало показатели здоровых лиц ($p = 0,006$, $p < 0,001$ и $p < 0,001$ соответственно). Содержание Th17.1 было значимо ниже в группах больных с сенсibilизацией к *A. fumigatus* по срав-

нению с контрольными показателями ($p = 0,001$ и $p = 0,016$ соответственно). Особенностью пациентов с АБЛА явилось значимо более высокое количество Th2 — 11,10% (8,80–13,00) по сравнению с больными БА Asp+ (8,35% (7,40–9,80), $p = 0,035$) и БА Asp– (8,05% (5,75–10,10), $p = 0,017$). Выявлена положительная корреляционная связь между количеством Th2 и уровнями IgE ($r = 0,375$, $p = 0,017$), sIgE к *A. fumigatus* ($r = 0,339$, $p = 0,030$), TARC ($r = 0,577$, $p = 0,001$) и отрицательная корреляционная связь с ОФВ1 ($r = -0,381$, $p = 0,022$) и числом Th17.1 ($r = -0,335$, $p = 0,032$).

Важной субпопуляцией Т-хелперов являются фолликулярные Т-хелперы (Tfh) — CXCR5-позитивные клетки. По аналогии с традиционными Th, среди CXCR5⁺CD45RA⁻CD4⁺ Т-клеток памяти были выделены: Tfh1 (CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻), Tfh2 (CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁺), Tfh17 (CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁻), Tfh17.1 (CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺) [6]. Процентное содержание Tfh2 у больных обеих групп с сенсibilизацией к *A. fumigatus* было значимо выше по сравнению с контрольными значениями ($p = 0,049$ и $p = 0,01$ соответственно). У пациентов с АБЛА установлено более высокое число Tfh2 2,81% (2,00–3,70) по сравнению с больными БА Asp– (1,80% (1,60–2,85), $p = 0,021$). Установлено снижение числа Tfh1 у больных БА Asp– по сравнению с показателями больных БА Asp+ ($p = 0,031$) и контрольной группы ($p = 0,040$). У больных БА Asp+ выявлено повышение количества Tfh17 по сравнению со значениями условно здоровых лиц ($p = 0,042$). Значимых различий в содержании Tfh17.1 между группами, включенными в исследование, установлено не было. Выявлена положительная корреляционная связь между количеством Tfh2 и уровнями IgE ($r = 0,383$, $p = 0,015$), sIgE к *A. fumigatus* ($r = 0,373$, $p = 0,016$) и TARC ($r = 0,380$, $p = 0,021$).

Установлено, что относительное количество CD4⁺CD127⁻CD25⁺ Treg у пациентов с АБЛА, БА Asp+ и БА Asp– достоверно превышало показатель контрольной группы (11,00% (9,10–14,00), 10,50% (7,50–12,85) и 10,20% (7,00–12,15) vs 6,7% (5,75–7,00), $p < 0,001$, $p = 0,002$ и $p = 0,002$ соответственно). Известно, что Treg играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза [27]. Однако значимых различий по числу Treg между исследуемыми группами больных не выявлено.

На заключительном этапе исследования провели сравнительный анализ уровней патогенетически значимых цитокинов, продуцируемых клетками цельной крови больных БА Asp– и АБЛА в ответ на инкубацию с аллергеном *A. fumigatus*. Для анализа цитокинового профиля проводили вычисление индекса стимуляции (ИС) как соотношения индуцированной продукции цитокинов к их спонтанной выработке. Установлено, что у здоровых доноров аллерген *A. fumigatus* активировал лимфоциты к про-

дукции $IFN\gamma$, но не к выработке IL-10 и IL-13 (табл. 3), что согласуется с результатами других авторов [18]. В группе больных АБЛА по сравнению с группой контроля были выявлены значительно более низкие уровни $IFN\gamma$ (15,0 пг/мл (10,0–32,0) vs 32,0 пг/мл (20,8–49,0), $p = 0,001$) и значения ИС (1,00 (0,98–1,37) vs 5,76 (2,14–11,01), $p < 0,001$) в ответ на индукцию грибковым аллергеном. Напротив, клетки крови больных АБЛА синтезировали более высокие уровни IL-10 (126,0 пг/мл (94,4–159,0) vs 21,2 пг/мл (10,0–36,0) и 24,5 пг/мл (22,0–32,5), $p < 0,001$ и $p < 0,001$ соответственно) и IL-13 (104,0 пг/мл (72,4–250,0) vs 44,5 пг/мл (42,0–56,0) и 59,0 пг/мл (38,4–59,6), $p < 0,001$ и $p = 0,001$ соответственно) по сравнению с показателями больных БА Asp– и здоровых лиц. Следовательно, индексы стимуляции для IL-10 (4,96 (2,95–41,83) vs 0,58 (0,25–1,55) и 1,14 (1,06–1,50), $p = 0,001$, $p = 0,001$, соответственно) и IL-13 (3,67 (2,08–6,56) vs 0,97 (0,84–1,10) и 1,09 (0,95–1,20), $p < 0,001$, $p = 0,001$, соответственно) значительно отличались от значений больных БА Asp– и контрольной группы.

В группе больных БА Asp– не было выявлено способности грибкового аллергена стимулировать клетки крови к выработке IL-10 и IL-13, так как показатели ИС не отличались от контрольных значений ($p = 0,13$ и $p = 0,09$) (табл. 3). Полученные данные могут свидетельствовать о выраженной активации клонов Т-лимфоцитов, специфичных к другим аэроаллергенам, но не к плесневым микромицетам, что подтверждает отсутствие у больных БА Asp– sIgE к *A. fumigatus*. Таким образом, антиген-специфическая стимуляция клеток крови больных АБЛА вызывала достоверно более высокую продукцию IL-10 и IL-13 и низкую выработку $IFN\gamma$ по сравнению со значениями в группе контроля и БА.

Обсуждение

Опубликованы результаты исследований, согласно которым микогенная сенсibilизация ассоциирована с тяжелым течением БА, развитием бронхоэктазов и фиброза [15, 26]. В работе Woolnough K.F. и соавт. показано, что уровень sIgE

Таблица 3. Показатели спонтанной и антиген-стимулированной продукции цитокинов у больных бронхиальной астмой без сенсibilизации к *A. fumigatus* и АБЛА, Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Table 3. Parameters of spontaneous and antigen-stimulated cytokine production in patients with bronchial asthma without sensitization to *A. fumigatus* and ABPA, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Показатель Parameters	Группы/Groups			Достоверно значимые различия p value
	Контрольная группа Control group n = 16	БА без сенсibilизации к <i>A. fumigatus</i> BA without sensitization to <i>A. fumigatus</i> n = 16	АБЛА ABPA n = 15	
IFNγ спонтанный, пг/мл IFN γ spontaneous, pg/ml	7,7 (3,45–10,35)	7,3 (5,0–19,4)	13,4 (6,0–18,8)	–
IFNγ <i>A. fumigatus</i>, пг/мл IFN γ <i>A. fumigatus</i> , pg/ml	32,0 (20,8–49,0)	21,0 (16,0–32,0)	15,0 (10,0–32,0)	* $p = 0,001$
ИС IFNγ IS IFN γ	5,76 (2,14–11,01)	1,87 (1,18–5,83)	1,00 (0,98–1,37)	* $p < 0,001$ ** $p = 0,026$ * $p = 0,049$
IL-10 спонтанный, пг/мл IL-10 spontaneous, pg/ml	19,5 (16,0–28,5)	23,2 (17,4–45,0)	22,0 (6,4–42,0)	–
IL-10 <i>A. fumigatus</i>, пг/мл IL-10 <i>A. fumigatus</i> , pg/ml	24,5 (22,0–32,5)	21,2 (10,0–36,0)	126,0 (94,4–159,0)	* $p < 0,001$ ** $p < 0,001$
ИС IL-10 IS IL-10	1,14 (1,06–1,50)	0,58 (0,25–1,55)	4,96 (2,95–41,83)	* $p = 0,001$ ** $p = 0,001$
IL-13 спонтанный, пг/мл IL-13 spontaneous, pg/ml	53,0 (40,0–61,2)	52,1 (42,0–54,1)	38,2 (31,8–52,0)	–
IL-13 <i>A. fumigatus</i>, пг/мл IL-13 <i>A. fumigatus</i> , pg/ml	59,0 (38,4–59,6)	44,5 (42,0–56,0)	104,0 (72,4–250,0)	* $p = 0,001$ ** $p < 0,001$
ИС IL-13 IS IL-13	1,09 (0,95–1,20)	0,97 (0,84–1,10)	3,67 (2,08–6,56)	* $p = 0,001$ ** $p < 0,001$

Примечание. * p — статистическая значимость различий между группой АБЛА и контролем; ** p — статистическая значимость различий между группами АБЛА и БА без сенсibilизации к *A. fumigatus*; * p — статистическая значимость различий между группой БА без сенсibilизации к *A. fumigatus* и контролем (U-критерий Манна–Уитни).

Note. * p — statistical significance of differences between ABPA and control groups; ** p — statistical significance of differences between ABPA and BA without sensitization to *A. fumigatus* groups; * p — statistical significance of differences between BA without sensitization to *A. fumigatus* and control groups (Mann–Whitney U-test).

к термотолерантным нитчатым грибам, в частности к *A. fumigatus*, но не уровень общего IgE, был взаимосвязан с фиксированной обструкцией воздушного потока и рядом радиологических изменений у больных БА различной степени тяжести. Авторы сделали вывод о возможном риске повреждения легких у всех больных с сенсибилизацией к *A. fumigatus* независимо от того, соответствуют ли они критериям АБЛА [33]. Сходные результаты были получены нами ранее. Показано, что сенсибилизация к *A. fumigatus*, но не к другим аэроаллергенам, существенно ухудшает течение БА [4]. В настоящем исследовании у больных с сенсибилизацией к *A. fumigatus* установлены худшие показатели ОФВ1 и результатов АСТ. Выявлена отрицательная корреляционная связь между уровнями sIgE к *A. fumigatus* и показателем ОФВ1 ($r = -0,605$, $p < 0,001$). Полученные данные указывают на более выраженное воспаление и возможность деструктивных изменений в легких у больных БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus*, что диктует необходимость дальнейшего детального изучения особенностей иммунопатогенеза микогенной аллергии.

На современном этапе известно, что иммунные реакции, возникающие в дыхательных путях при контакте с грибковыми аллергенами, вовлекают тучные клетки, базофилы, эозинофилы, врожденные лимфоидные клетки, М2-поляризованные макрофаги и Th2 [29]. Вдыхаемые грибковые аллергены поглощаются дендритными клетками (DCs). Активированные DCs мигрируют в дренирующие лимфатические узлы, где они контролируют дифференцировку CD4⁺ Т-клеток [25]. Дифференцировка CD4⁺ Т-клеток в Th2 зависит от TSLP, TARC/CCL17 и MCD/CCL22. Появляется все больше доказательств того, что именно TARC играет важную роль в патогенезе аллергических реакций [16]. Так установлено более высокое содержание TARC в сыворотке крови у пациентов с БА по сравнению с контрольной группой. Обращает внимание, что концентрация хемокина увеличивалась с возрастом [17]. Yormaz B. и соавт. сообщили, что сывороточные уровни TARC можно использовать в качестве биомаркеров эозинофильного фенотипа БА [35].

В соответствии с ранее опубликованными данными [5], мы выявили значимые различия уровней TARC у больных АБЛА и больных БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus* по сравнению с показателями больных группы сравнения. Положительная корреляционная связь TARC с уровнями общего IgE, sIgE к *A. fumigatus* и отрицательная с ОФВ1 подтверждает важное значение данного хемокина в развитии аллергического воспаления у больных с микогенной сенсибилизацией и указывает на возможность его использования в дифференциальной диагностике.

После активации аллергеном Т-клетки разделяются на популяции эффекторных Т-клеток

и Т-клетки памяти, последние подразделяются на CCR7⁻ эффекторные Т-клетки памяти (Tem) и CCR7⁺ центральные Т-клетки памяти (Tcm) [6]. Считают, что Т-клетки памяти связаны с хроническими воспалительными заболеваниями [21, 22]. Однако конкретные субпопуляции Т-клеток памяти человека, ответственные за аллергическое воспаление при различных эндотипах БА, недостаточно хорошо охарактеризованы. Поэтому крайне важно определить, какие субпопуляции Т-клеток памяти связаны с хроническим воспалением в легких у больных с сенсибилизацией к *A. fumigatus*. Можно предположить, что Т-клетки больных БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus* обладают уникальными фенотипами и функциями, которые могут поддерживать хроническое воспаление в нижних дыхательных путях.

В ходе исследования было выявлено значительное увеличение циркулирующих CD4⁺ CD45RA⁻ Т-клеток памяти у всех больных БА по сравнению с группой контроля. Известно, что CD4⁺ Т-клетки памяти могут быстро пролиферировать в ответ на повторное проникновение специфического антигена и приобретать эффекторный фенотип с секрецией цитокинов и хемокинов [24]. Следовательно, долгоживущие Т-клетки памяти, обнаруженные в крови пациентов с БА, могут играть важную роль в хроническом воспалении нижних дыхательных путей в ответ на различные аллергены. Ранее сообщалось об увеличении числа CCR4⁺ Th2 у пациентов с БА [20, 32]. Анализ наших данных установил, что у всех пациентов, включенных в исследование, повышено число циркулирующих Th2 клеток памяти по сравнению с контрольной группой. У больных АБЛА число Th2 клеток памяти было выше, чем у больных БА с сенсибилизацией и без таковой к *A. fumigatus*. Напротив, установлено снижение числа Th17.1 у больных АБЛА и БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus* по сравнению с показателями условно здоровых добровольцев.

Известно, что после активации Th2 продуцируют ряд провоспалительных цитокинов: IL-4, IL-13, IL-5 и IL-9. За пролиферацию аллерген-специфических В-клеток и переключение изотипов иммуноглобулинов на IgE класс отвечают IL-4 и IL-13. Главный цитокин Th2 — IL-13 — индуцирует метаплазию бокаловидных клеток, фиброз и гиперреактивность бронхов, и в сочетании с IL-5 способствует пролиферации и выживанию эозинофилов в дыхательных путях [16]. В нашем исследовании, усиление активности Th2 клеток памяти у пациентов с АБЛА подтверждает повышение секреции IL-13 на фоне снижения выработки IFN γ в ответ на специфическую стимуляцию клеток крови грибковым аллергеном по сравнению с группой контроля и больными БА. Полученные данные согласуют-

ся с ранее представленными результатами в другом исследовании. Показано, что у пациентов с АБЛА наблюдалось увеличение индуцированных *Aspergillus* spp. IL-5 и IL-13 и снижение продукции IFN γ по сравнению со здоровым контролем [10]. Установленная нами положительная корреляционная связь между количеством Th2 клеток памяти и уровнями sIgE, IgE, TARC и отрицательная с ОФВ1 подтверждает клиническую значимость данного показателя у пациентов с микогенной сенсибилизацией. Значимые различия по числу CXCR3⁺ Th1 и «классических» CCR6⁺CCR4⁺ Th17 в крови пациентов и контрольных субъектов не были выявлены, что совпадает с результатами других авторов [32].

После активации антигеном CXCR5⁺ В-лимфоциты мигрируют в первичные фолликулы лимфатических узлов, где происходит переключение изотипа и «созревание» аффинитета иммуноглобулинов при участии фолликулярных дендритных клеток и Tfh. Отличительной чертой Tfh является экспрессия CXCR5. Считается, что Tfh2 легко вступают в контакт с В-клетками для активации через CXCL13, лиганд CXCR5, секретируемый различными клетками, включая фолликулярные дендритные клетки, эндотелиальные клетки, а также клетки Tfh [13]. Опубликованы сведения о связи дифференцировки Th2 и Tfh2, согласно которым они вносят вклад в патогенез аллергического воспаления, опосредованного IgE [19, 30]. В последнее время появляются новые данные о том, что Tfh, а не Th2, играют решающую роль в контроле продукции IgE [34]. В нашем исследовании наибольшее число Tfh2 установлено у больных АБЛА, а также у больных БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus* и выявлена положительная корреляционная связь между количеством Tfh2 и уровнями IgE, sIgE к *A. fumigatus* и TARC, но отсутствовала связь с показателями функции дыхания.

Известно, что CD4⁺ Т-лимфоциты содержат субпопуляцию Т-регуляторных клеток, обеспечивающих аутоотолерантность к собственным

антигенам и сдерживающих чрезмерную активность клеток иммунной системы. Адаптивные регуляторные Т-хелперы образуются при иммунном ответе и служат фактором, ограничивающим иммунный ответ на его заключительных стадиях за счет действия CTLA-4 и продукции противовоспалительных цитокинов. Адаптивные Treg характеризуются экспрессией TGF- β , IL-10 и IL-4. TGF- β и IL-10 способствуют подавлению иммунного ответа, опосредованного функциональной активностью Th1 и Th2 [27]. В настоящем исследовании было установлено, что наиболее высокое число Treg выявлено у больных АБЛА, что согласуется с повышенной продукцией IL-10 у данной категории больных. Усиление активности Treg может отражать степень противодействия хронической воспалительной реакции, поддерживаемой грибковыми аллергенами в том случае, когда термотолерантные грибы способны длительно сохраняться в дыхательных путях [29].

Заключение

Результаты проведенного исследования соответствуют сформированным ранее представлениям о доминировании эозинофильного воспаления, развивающегося в дыхательных путях больных БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus*. Положительная корреляционная связь числа циркулирующих Th2 и Tfh2 с активностью синтеза плазматическими клетками IgE и sIgE к *A. fumigatus*, а также уровнями TARC в сыворотке крови указывает на важную роль этих клеток в патогенезе микогенной аллергии. Учитывая все более широкое использование антицитокиновой биологической терапии у больных БА, изучение патогенетических механизмов БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus* необходимо для дальнейшей разработки терапевтических моноклональных антител, применение которых повысит уровень контроля БА и позволит снизить объем системной стероидной терапии.

Список литературы/References

1. Барковская М.Ш., Блинова Е.А., Гришина Л.В., Леонова М.И., Непомнящих В.М., Демина Д.В., Козлов В.А. Содержание CD4⁺ и CD8⁺ эффекторных клеток памяти и пролиферативная активность Т-лимфоцитов при бронхиальной астме // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 3. С. 503–516. [Barkovskaya M.S., Blinova E.A., Grishina L.V., Leonova M.I., Nepomniashchikh V.M., Demina D.V., Kozlov V.A. Contents of CD4⁺ and CD8⁺ effector memory cells and proliferative activity of T lymphocytes in bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, vol. 21, no. 3, pp. 503–516. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-503-516
2. Бибкова А.А., Сысоев К.А., Семенов А.В., Любимова Н.С., Арсентьева Н.А., Трофимов В.И., Тотолян Арег А. Значимость определения некоторых хемокинов и их рецепторов у больных бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 1–2. С. 109–188. [Bibkova A.A., Syssoev K.A., Semenov A.V., Lubimova N.S., Arsentieva N.A., Trofimov V.I., Totolian Areg A. Evaluation and clinical significance of chemokines and their specific receptors in patients with bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 1–2, pp. 109–188. (In Russ.)]
3. Виткина Т.И., Новгородцева Т.П., Калинина Е.П., Лобанова Е.Г., Антонюк М.В. Иммунные механизмы формирования бронхиальной астмы контролируемого и частично контролируемого течения // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 3. С. 495–502. [Vitkina T.I., Novgorodtseva T.P., Kalinina E.P., Lobanova E.G., Antonyuk M.V. Immune mechanisms for development of controlled and partially controlled asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, vol. 21, no. 3, pp. 495–502. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-495-502

4. Козлова Я.И., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Аак О.В., Кузнецов В.Д., Фролова Е.В., Васильева Н.В., Клишко Н.Н. Сенсибилизация к *Aspergillus* spp. у больных бронхиальной астмой // *Врач*. 2021. Т. 32, № 5. С. 50–55. [Kozlova Y., Uchevatkina A., Filippova L., Aak O., Kuznetsov V., Frolova E., Vasilyeva N., Klimko N. Sensitization to *Aspergillus* spp. in patients with asthma. *Vrach = The Doctor*, 2021, vol. 32, no. 5, pp. 50–55. (In Russ.)] doi: 10.29296/25877305-2021-05-09
5. Козлова Я.И., Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Учеваткина А.Е., Аак О.В., Соловьева Г.И., Клишко Н.Н. Диагностические маркеры аллергического бронхолегочного аспергиллеза у больных бронхиальной астмой // *Медицинская иммунология*. 2018. Т. 20, № 4. С. 561–570. [Kozlova Y.I., Frolova E.V., Filippova L.V., Uchevatkina A.E., Aak O.V., Solovyeva G.I., Klimko N.N. Diagnostic markers of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, vol. 20, no. 4, pp. 561–570. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-561-570
6. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян Арег 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. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2016, vol. 18, no. 3, pp. 239–250. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-239-250
7. Смольникова М.В., Смирнова С.В., Ильенкова Н.А., Коноплева О.С. Иммунологические маркеры неконтролируемого течения atopической бронхиальной астмы у детей // *Медицинская иммунология*. 2017. Т. 19, № 4. С. 453–460. [Smolnikova M.V., Smirnova S.V., Ilyenkova N.A., Konopleva O.S. Immunological markers of uncontrolled atopic bronchial asthma in children. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2017, vol. 19, no. 4, pp. 453–460. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-453-460
8. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // *Медицинская иммунология*. 2012. Т. 14, № 3. С. 255–268. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology «Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers» (Draft). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 3, pp. 255–268. (In Russ.)]
9. Agarwal R., Chakrabarti A., Shah A., Gupta D., Meis J.F., Guleria R., Moss R., Denning D.W. For the ABPA complicating asthma ISHAM working group 2013. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin. Exp. Allergy*, 2013, vol. 43, no. 8, pp. 850–873. doi: 10.1111/cea.12141
10. Becker K.L., Gresnigt M.S., Smeekens S.P., Jacobs C.W., Magis-Escurra C., Jaeger M., Wang X., Lubbers R., Oosting M., Joosten L.A., Netea M.G., Reijers M.H., van de Veerdonk F.L. Pattern recognition pathways leading to a Th2 cytokine bias in ABPA patients. *Clin. Exp. Allergy*, 2015, vol. 45, pp. 423–437. doi: 10.1111/cea.12354
11. Campbell J.J., Brightling C.E., Symon F.A., Qin S., Murphy K.E., Hodge M., Andrew D.P., Wu L., Butcher E.C., Wardlaw A.J. Expression of chemokine receptors by lung T cells from normal and asthmatic subjects. *J. Immunol.*, 2001, vol. 166, no. 4, pp. 2842–2848. doi: 10.4049/jimmunol.166.4.2842
12. Carsin A., Romain T., Ranque S., Reynaud-Gaubert M., Dubus J.-C., Mege J.-L., Vitte J. *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis: an update on immune interactions and molecular diagnostics in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy*, 2017, vol. 11, pp. 1632–1642. doi: 10.1111/all.13204
13. 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
14. Denning D.W., Pashley C., Hartl D., Wardlaw A., Godet C., Del Giacco S., Delhaes L., Sergejeva S. Fungal allergy in asthma: state of the art and research needs. *Clin. Transl. Allergy*, 2014, vol. 4: 14. doi: 10.1186/2045-7022-4-14
15. Goh K., Yii A.C.A., Lapperre T., Chan A.K., Chew F.T., Chotirmall S.H., Koh M.S. Sensitization to *Aspergillus* species is associated with frequent exacerbations in severe asthma. *J. Asthma Allergy*, 2017, vol. 10, pp. 131–140. doi: 10.2147/JAA.S130459
16. Hirata H., Yukawa T., Tanaka A., Miyao T., Fukuda T., Fukushima Y., Kurasawa K., Arima M. Th2 cell differentiation from naive CD4+ T cells is enhanced by autocrine CC chemokines in atopic diseases. *Clin. Exp. Allergy*, 2019, vol. 49, no. 4, pp. 474–483. doi: 10.1111/cea.13313
17. Jo K.M., Lim H.K., Sull J.W., Choi E., Lee J.S., Cheong M.A., Hong M.H., Kim Y., Kim I.S. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17 and IgE are associated with elderly asthmatics. *Immun. Ageing*, 2018, vol. 15: 13. doi: 10.1186/s12979-018-0118-7
18. Jolink H., de Boer R., Willems L.N., van Dissel J.T., Falkenburg J.H., Heemskerk M.H. T helper 2 response in allergic bronchopulmonary aspergillosis is not driven by specific *Aspergillus* antigens. *Allergy*, 2015, vol. 70, no. 10, pp. 1336–1339. doi: 10.1111/all.12688
19. Kamekura R., Shigehara K., Miyajima S., Jitsukawa S., Kawata K., Yamashita K., Nagaya T., Kumagai A., Sato A., Matsumiya H., Ogasawara N., Seki N., Takano K., Kokai Y., Takahashi H., Himi T., Ichimiya S. Alteration of circulating type 2 follicular helper T cells and regulatory B cells underlies the comorbid association of allergic rhinitis with bronchial asthma. *Clin. Immunol.*, 2015, vol. 158, no. 2, pp. 204–211. doi: 10.1016/j.clim.2015.02.016
20. Kurashima K., Fujimura M., Myou S., Ishiura Y., Onai N., Matsushima K. Asthma severity is associated with an increase in both blood CXCR3+ and CCR4+ T cells. *Respirology*, 2006, vol. 11, no. 2, pp. 152–157. doi: 10.1111/j.1440-1843.2006.00822.x
21. Lloyd C.M., Hessel E.M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, vol. 10, no. 12, pp. 838–848. doi: 10.1038/nri2870
22. Moaaz M., Youssry S., Baess A., Abed A., Moaaz M. Immune signature of CCR7+ central memory T cells associates with disease severity and Immunoglobulin E in bronchial asthma. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, vol. 53, no. 3, pp. 115–127. doi: 10.23822/EurAnnACI.1764-1489.168
23. Pashley C.H., Wardlaw A.J. Allergic fungal airways disease (AFAD): an under-recognised asthma endotype. *Mycopathologia*, 2021, vol. 186, no. 5, pp. 609–622. doi: 10.1007/s11046-021-00562-0
24. Pepper M., Jenkins M.K. Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nat. Immunol.*, 2011, vol. 12, no. 6, pp. 467–471. doi: 10.1038/ni.2038
25. Ramirez-Ortiz Z.G., Means T.K. The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (*A. fumigatus*, *C. neoformans* and *C. albicans*). *Virulence*, 2012, vol. 3, pp. 635–646. doi: 10.4161/viru.22295
26. Sio Y.Y., Pang S.L., Say Y.H., Teh K.F., Wong Y.R., Shah S.M.R., Reginald K., Chew F.T. Sensitization to airborne fungal allergens associates with asthma and allergic rhinitis presentation and severity in the singaporean/malaysian population. *Mycopathologia*, 2021, vol. 186, no. 5, pp. 583–588. doi: 10.1007/s11046-021-00532-6

27. Sjaastad L.E., Owen D.L., Tracy S.I., Farrar M.A. Phenotypic and functional diversity in regulatory T cells. *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2021, vol. 9: 715901. doi: 10.3389/fcell.2021.715901
28. The Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2022. URL: <https://ginasthma.org/gina-reports> (10.08.2022)
29. Tiwary M., Samarasinghe A.E. Initiation and pathogenesis of severe asthma with fungal sensitization. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 4: 913. doi: 10.3390/cells10040913
30. Varricchi G., Harker J., Borriello F., Marone G., Durham S.R., Shamji M.H. T follicular helper (T_{fh}) cells in normal immune responses and in allergic disorders. *Allergy*, 2016, vol. 71, no. 8, pp. 1086–1094. doi: 10.1111/all.12878
31. Wardlaw A.J., Rick E.M., Pur Ozyigit L., Scadding A., Gaillard E.A., Pashley C.H. New perspectives in the diagnosis and management of allergic fungal airway disease. *J. Asthma Allergy*, 2021, vol. 14, pp. 557–573. doi: 10.2147/JAA.S251709
32. Wiest M., Upchurch K., Yin W., Ellis J., Xue Y., Lanier B., Millard M., Joo H., Oh S. Clinical implications of CD4⁺ T cell subsets in adult atopic asthma patients. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2018, vol. 14: 7. doi: 10.1186/s13223-018-0231-3
33. Woolnough K.F., Richardson M., Newby C., Craner M., Bourne M., Monteiro W., Siddiqui S., Bradding P., Pashley C.H., Wardlaw A.J. The relationship between biomarkers of fungal allergy and lung damage in asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2017, vol. 47, no. 1, pp. 48–56. doi: 10.1111/cea.12848
34. Yao Y., Chen C.L., Yu D., Liu Z. Roles of follicular helper and regulatory T cells in allergic diseases and allergen immunotherapy. *Allergy*, 2021, vol. 76, no. 2, pp. 456–470. doi: 10.1111/all.14639
35. Yormaz B., Menevse E., Cetin N., Esin Celik Z., Bakir H., Tulek B., Korez M.K., Suerdem M. Diagnostic value of thymus and activation-regulated chemokine and of periostin in eosinophilic asthma: a prospective study. *Allergy Asthma Proc.*, 2021, vol. 42, no. 1, pp. e30–e39. doi: 10.2500/aap.2021.42.200102

Авторы:

Козлова Я.И., к.м.н., доцент кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Фролова Е.В., к.м.н., зав. НИЛ иммунологии и аллергологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Кудрявцев И.В., к.б.н., зав. лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Учеваткина А.Е., к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Филиппова Л.В., к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Аак О.В., к.х.н., ведущий научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Тараскина А.Е., к.б.н., зав. НИЛ молекулярно-генетической микробиологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Соболев А.В., д.м.н., профессор кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Васильева Н.В., д.б.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, директор НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Климко Н.Н., д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Kozlova Ya.I., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Frolova E.V., PhD (Medicine), Head of the Research Laboratory of Allergology and Immunology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head of the Cell Immunology Laboratory, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Assistant Professor, Department of Immunology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Uchevatkina A.E., PhD (Medicine), Senior Researcher, Research Laboratory of Allergology and Immunology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Filippova L.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Research Laboratory of Allergology and Immunology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Aak O.V., PhD (Chemistry), Leading Researcher, Research Laboratory of Allergology and Immunology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Taraskina A.E., PhD (Biology), Head of the Research Laboratory of Molecular Genetic Microbiology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Sobolev A.V., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Vasilyeva N.V., PhD, MD (Biology), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Director, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Klimko N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation.

SEROGROUPS AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF SALMONELLA ISOLATED FROM PEOPLE AND FOOD ITEMS IN SOUTHERN PROVINCES OF VIETNAM

S.A. Egorova¹, Q.N. Truong², L.A. Kaftyreva^{1,3}, E.A. Kozhukhova⁴, M.A. Makarova^{1,3}, Q.H. Cuong², H.N. Vu², T.D. Huong², T.Q.T. Lan⁵, K.V. Tram⁶, T.N. Long⁶, T.N.N. Diep⁶, L.K.B. Tu⁶, L.K.N. Thu⁶

¹ St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

² Pasteur Institute in Ho Chi Minh City, Vietnam

³ I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

⁴ Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

⁵ University of Agriculture and Forestry (Nong Lam University), Ho Chi Minh, Vietnam

⁶ Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Ho Chi Minh City, Vietnam

Abstract. This article presents current relevant data on the serogroups and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated in the southern provinces of the Socialist Republic of Vietnam. There were examined 189 *Salmonella* strains isolated from: human feces in acute diarrhea (86 strains); and pork samples (103 strains). Serological O-group identification was performed by slide agglutination with O- and H-antisera and multiplex PCR to detect H phase-1 and phase-2. Antimicrobial susceptibility testing was performed by using the disk-diffusion method according to the EUCAST (version 2019) recommendations. Strains isolated from humans predominantly belonged to O4 group (69.8%). The percentage of other serogroups varied from 1.2% (rare group O16) to 11.6% (O9). About a half of strains (44.7%) isolated from pork samples turned out to belong to the O3,10 serogroup (vs 7.0% of strains from humans). Serogroups O7, O4 and O8 were less frequent (22.3%, 14.6% and 13.6%, respectively). Single strains belonged to serogroups O9, O13, and O18. Regardless of the isolation source, about 80% of *Salmonella* strains were resistant to antibiotics from different antimicrobial groups (besides carbapenems): 67.0% were resistant to tetracycline; about half were resistant to pefloxacin, ampicillin and chloramphenicol (54.0%, 47.1%, 46.6%); and up to 40% were resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole and nalidixic acid. The proportion of strains resistant to ceftriaxone and gentamycin was markedly higher in those of human vs pork origin: 12.8% vs 1.0% and 30.2 vs 1.9%, respectively. Moreover, 62.8% and 43.7% strains of human and pork origin, respectively, showed multidrug resistance (to 3 and more antimicrobial groups). In addition, simultaneous resistance to 6 antimicrobial groups was detected much more frequently in *Salmonella* strains isolated from humans vs pork samples (15.1% vs 1.0%, respectively). Multidrug resistance (MDR) was observed in strains of different serovars, predominantly *S. Typhimurium* (36.4%). The predominant MDR (30.3%) phenotype (AMP, TE, QN, C, SXT) was revealed in serovars of *S. Typhimurium*, *S. Bredeney*, *S. Corvallis*, *S. Give*, *S. London*, *S. Rissen*, and *S. Meleagridis*. Thus, *Salmonella* strains isolated in the southern Vietnamese provinces featured resistance to fluoro-

Адрес для переписки:

Егорова Светлана Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-48-83 (служебн.).
E-mail: egorova72@mail.ru

Contacts:

Svetlana A. Egorova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-48-83 (office).
E-mail: egorova72@mail.ru

Для цитирования:

Егорова С.А., Чуонг К.Н., Кафтырева Л.А., Кожухова Е.А., Макарова М.А., Куонг К.Х., Ву Х.Н., Хуонг Т.З., Лан Т.К.Ч., Чам К.В., Лонг Т.Н., Диеп Т.Н.Н., Ту Л.К.Б., Тху Л.К.Н. Серологическая структура и чувствительность к антибиотикам штаммов *Salmonella*, выделенных от людей и из пищевых продуктов в южных провинциях Вьетнама // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1081–1090. doi: 10.15789/2220-7619-SPA-1954

Citation:

Egorova S.A., Truong Q.N., Kaftyreva L.A., Kozhukhova E.A., Makarova M.A., Cuong Q.H., Vu H.N., Huong T.D., Lan T.Q.T., Tram K.V., Long T.N., Diep T.N.N., Tu L.K.B., Thu L.K.N. Serogroups and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from people and food items in southern provinces of Vietnam // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1081–1090. doi: 10.15789/2220-7619-SPA-1954

quinolones and cephalosporins. Taking into account simultaneous loss of susceptibility to “old” antimicrobials (ampicillin, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole), it crucially restricts the list of effective medicines to treat complicated salmonellosis cases.

Key words: *Salmonella*, antimicrobial resistance, multidrug resistance, serovar.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ШТАММОВ *SALMONELLA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ И ИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ В ЮЖНЫХ ПРОВИНЦИЯХ ВЬЕТНАМА

Егорова С.А.¹, Чуонг К.Н.², Кафтырева Л.А.^{1,3}, Кожухова Е.А.⁴, Макарова М.А.^{1,3}, Куонг К.Х.², Ву Х.Н.², Хуонг Т.З.², Лан Т.К.Ч.⁵, Чам К.В.⁶, Лонг Т.Н.⁶, Диен Т.Н.Н.⁶, Ту Л.К.Б.⁶, Тху Л.К.Н.⁶

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

² Институт Пастера в г. Хо Ши Мин, г. Хо Ши Мин, Социалистическая Республика Вьетнам

³ ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Университет сельского и лесного хозяйства, г. Хо Ши Мин, Социалистическая Республика Вьетнам

⁶ Департамент животноводства и ветеринарии г. Хо Ши Мин, Социалистическая Республика Вьетнам

Резюме. В статье представлены современные данные о серогрупповой структуре и чувствительности к антибиотикам штаммов *Salmonella*, выделенных в южных провинциях Социалистической Республики Вьетнам. Всего исследовано 189 штаммов из коллекции Института Пастера в г. Хошимин: выделенных от людей — 86 и из свинины — 103 штамма. Штаммы идентифицировали до серовара с использованием реакции агглютинации на стекле с О- и Н-сыворотками и мультиплексных ПЦР для выявления Н 1 и 2 фазы. Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом согласно рекомендациям EUCAST (2019 г.). Штаммы, выделенные от людей, преимущественно принадлежали серогруппе О4 (69,8%), доля штаммов других серогрупп колебалась от 1,2% (редкая группа О16) до 11,6% (О9). Около половины штаммов (44,7%), выделенных из свинины, относились к серогруппе О3,10 (от людей — только 7,0% штаммов); штаммы серогрупп О7, О4 и О8 выделялись значительно реже (22,3%, 14,6% и 13,6%); к группам О9, О13 и О18 принадлежали единичные штаммы. Вне зависимости от источника выделения около 80,0% штаммов *Salmonella* были устойчивы к антибиотикам различных групп (исключая карбапенемы): 70,0% — к тетрациклам, около половины (54,0%, 47,1% и 46,6%) — к пefлоксацину, аминопенициллинам и хлорамфениколу, почти 40% — к триметоприм/сульфаметоксазолу и налидиксовой кислоте. Доля устойчивых к цефтриаксону и гентамицину была значительно выше у штаммов, выделенных от людей, чем из свинины: 12,8% и 1,0%, 30,2% и 1,9% соответственно. Множественной резистентностью (к 3 и более группам антибиотиков) обладали 62,8% штаммов, выделенных от людей и 43,7% — из свинины. Следует отметить, что резистентность к 6 группам антибиотиков чаще выявляли у штаммов, выделенных от людей, чем из свинины (15,1% и 1,0% соответственно). Множественную резистентность отмечали у штаммов различных сероваров, но преимущественно у *S. Typhimurium* (36,4%). Наиболее часто встречали фенотип множественной устойчивости AMP, TE, QN, C, SXT (30,3%), выявленный у штаммов сероваров *S. Typhimurium*, *S. Bredeney*, *S. Corvallis*, *S. Give*, *S. London*, *S. Rissen*, *S. Meleagridis*. Таким образом, у штаммов *Salmonella*, выделенных в южных провинциях Вьетнама, выявлена устойчивость к современным препаратам выбора (фторхинолонам и цефалоспорином), что, наряду с потерей чувствительности к «традиционным» антибиотикам (ампициллин, хлорамфеникол, триметоприм/сульфаметоксазол), существенно сокращает арсенал антимикробных (этиотропных) препаратов, потенциально эффективных для терапии осложненных форм сальмонеллеза.

Ключевые слова: *Salmonella*, устойчивость к антибиотикам, множественная резистентность, серовар.

Introduction

According to WHO data, from 1 to 1.7 billion cases of acute diarrhea are registered annually. Thus, they are the leading infectious illness, followed only by acute respiratory infection. Globally, acute diarrhea accounts for more than 500 000 deaths in children, occupying second place in mortality in those younger than 5 years old (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>).

In Russia as well as in European countries, the causative agents in up to 70% of acute diarrheal cases (especially food-borne outbreaks) are Rotavirus and Norwalk viruses. The most widespread bacterial agents of acute diarrheal cases are *Salmonella* and *Campylobacter* [8, 12]. Salmonellosis is known to have different clinical patterns, predominantly resulting from digestive tract effects, with potential to spread beyond it with development of toxic and dehydration syndromes of various severity. *Salmonella*

has potential to cause food-born infection with small and large outbreaks [12].

In Vietnam, the prevalence of acute diarrhea in infants is 271 per 1000 children. In more than 70% of cases, there were detected such viruses as Rotavirus (50.0% of samples) and Norwalk (24.0%). Among bacterial agents, *Campylobacter* (20.0%), *Salmonella* (18.0%), and *Shigella* (16.0%) were found [9,15]. In 2009–2010 in Ho Chi Minh City, non-typhoid *Salmonella* were detected in 5.4% of acute diarrhea cases in children under 5 years old [24]. Compared to Russia, where serovar *S. Enteritidis* accounts for more than 80.0% of cases and has dominated for many years, in Vietnam the serogroup spectrum of *Salmonella* isolated both from humans and food is more diverse. For example, an examination of adult hospitalized cases in 2008–2013 revealed *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* in 48.0% and 26.0% of cases, respectively [20]. *Salmonella* isolated from healthy food workers in different years belonged to different serogroups and serovars. For example, *Salmonella* isolates in 2011 were as follows: serogroup E (32.7%); serovar *S. Paratyphi B* (29.1%); and serogroups C and B (18.2% and 10.9%, respectively). Strains isolated in 2012 belonged to: *S. Enteritidis* (30.0%); serogroup B (17.5%); serogroups C and D (except *S. Enteritidis*) (12.5%); and serogroups A and E (10.0%). In 2013, strains from serogroups B, E, and C dominated (55.6%, 22.2% and 16.7%, respectively) [23].

In Vietnam, there have been many examinations of samples taken from food-producing animals, poultry, prawns, fish, and food items as potential sources and vehicles of *Salmonella* transmission to humans. High levels of contamination with *Salmonella* (belonging to 28–53 serogroups) have been described [16, 17, 19, 22, 25, 26, 27].

Examination of pigs and chickens revealed that contaminated samples were found in 50.0% of poultry farms and in 70.0% of pig breeding farms. The isolates belonged to 28 serovars, with leading of: *S. Weltevreden* (up to 20.0%); *S. Typhimurium* (12.0%); and *Salmonella* 4:12: i:- (11%) [17, 25]. *S. Weltevreden* was detected in every fourth shrimp farm in the Mekong delta covering three Vietnamese provinces [19]. Some studies (2004–2016 in provinces of Southern Vietnam) showed that the prevalence of *Salmonella* isolated from pigs increased significantly from 5.2% to 64.4% of samples. In Vinh Long, *Salmonella* was isolated from sick and healthy pigs (61.5% and 8.8%, respectively). In Dong Thap, the percentage of *Salmonella* contaminated samples was 64.7% in chickens and 91.3% in pigs [16, 27].

Antimicrobial therapy is usually prescribed: to patients with systemic (invasive) salmonellosis; middle or severe course (e.g., fever longer than 48 hours); age less than 6 months or more than 50 years; with immune deficiency; or with severe concurrent diseases. Empiric therapy suggests prescribing fluoroquinolones, extended spectrum cephalosporins, or tri-

methoprim/sulfamethoxazole [1, 6, 10, 21]. However, *Salmonella* isolated from humans, animals, and food items is displaying increasing antimicrobial resistance in many countries [13]. In Russia, the percentage of such *Salmonella* strains (isolated from humans, animals, and food items) is up to 50–70.0% [2, 3, 4, 5, 7].

Most *Salmonella* strains (about 60.0%) examined by different researchers in 2004–2017 in Vietnam were resistant to such antibiotics as: ampicillin (more than 40.0% of strains); tetracycline (more than 50.0%); trimethoprim/sulfamethoxazole (up to 60.0%); chloramphenicol (up to 50.0%); and ciprofloxacin (more than 30.0% of strains) [16, 17, 18, 19, 22, 23, 25, 26, 27, 28]. According to different research data, from 17 to 52.2% of strains had multidrug resistance (MDR). *S. Kentucky ST198* was considered the most frequent MDR serovar, with high levels of resistance to β -lactams and quinolones.

Notably, there was one strain (from pork) exhibiting colistin resistance. It is the first colistin-resistant *Salmonella* found in meat in Vietnam [18,28]. Some data indicate that the percentage of *Salmonella* strains producing ESBL (TEM and CTX genetic families) is equal to 5.3%. Strains predominantly belonged to serogroup B, with *S. Paratyphi B* included [23]. This study's objective was to characterize the serogroup structure and to evaluate antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from humans and food samples in South Vietnam.

Materials and methods

The study was performed within a framework of scientific cooperation between the St. Petersburg Pasteur Institute and the Pasteur Institute in Ho Chi Minh City. The samples studied were 189 *Salmonella* strains isolated in South Vietnam: 86 strains from feces of humans with acute diarrhea; and 103 from pork samples.

Salmonella serological identification to O-group was first determined by slide agglutination with O-group antisera (St. Petersburg Scientific Research Institute of Vaccine and Serum, Russia). Phase-1 and phase-2 were then detected by multiplex PCR [11, 14], with subsequent confirmation by slide agglutination with phase-1 and phase-2 antisera.

Antimicrobial susceptibility testing was done according EUCAST recommendations (version 2019, https://www.eucast.org/ast_of_bacteria) by the disk-diffusion method with Mueller–Hinton agar and antibiotic disks (Oxoid). The tested antimicrobials belonged to different antibiotic classes: β -lactams (ampicillin, ceftazidime, ceftriaxone, meropenem); quinolones (nalidixic acid, pefloxacin); tetracycline; phenicols (chloramphenicol); trimethoprim/sulfamethoxazole; polymyxins (colistin); and aminoglycosides (gentamycin, amikacin). Results were interpreted according EUCAST criteria, version 2019 (<https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/>

Table 1. *Salmonella* serovars isolated from humans and pork in southern provinces of Vietnam (number of strains, proportion, 95% confidence interval)

O-group	Serovar	Number of strains isolated from		
		human	pork	Total
4	<i>S. Typhimurium</i>	40	5	45
	<i>S. Stanley</i>	12	0	12
	<i>S. Southampton</i>	2	1	3
	<i>S. Saintpaul</i>	2	0	2
	<i>S. Remo</i>	1	0	1
	<i>S. Heidelberg</i>	1	0	1
	<i>S. Derby</i>	0	1	1
	<i>S. Vuadens</i>	0	1	1
	<i>S. Bredeney</i>	0	3	3
	not identified	2	4	6
	Total O4	60 69.8%* 95% CI 58.9–79.2	15 14.6%* 95% CI 8.4–22.9	75 39.7% 95% CI 32.7–47.0
3,10	<i>S. Weltevreden</i>	1	1	2
	<i>S. Anatum</i>	0	8	8
	<i>S. Give</i>	0	13	13
	<i>S. Bloomsbury</i>	0	4	4
	<i>S. Epicrates</i>	0	1	1
	<i>S. Lexington</i>	0	5	5
	<i>S. London</i>	0	4	4
	<i>S. Meleagridis</i>	0	1	1
	not identified	5	9	14
	Total O3,10	6 7.0%* 95% CI 2.6–14.6	46 44.7%* 95% CI 34.9–54.8	52 27.5% 95% CI 21.3–34.5
7	<i>S. Choleraesuis</i>	2	0	2
	<i>S. Rissen</i>	1	4	5
	<i>S. Larochelle</i>	1	0	1
	<i>S. Eingedi</i>	0	1	1
	<i>S. Gatow</i>	0	1	1
	<i>S. Bonn</i>	0	2	2
	<i>S. Afula</i>	0	2	2
	<i>S. Lockleaze</i>	0	1	1
	<i>S. Djugu</i>	0	3	3
	<i>S. Virchow</i>	0	1	1
	<i>S. Nola</i>	0	1	1
	not identified	3	7	10
	Total O7	7 8.1% 95% CI 3.3–16.0	23 22.3% 95% CI 14.7–31.6	30 15.8% 95% CI 11.0–21.9
8	<i>S. Newport</i>	1	1	2
	<i>S. Corvalis</i>	0	7	7
	<i>S. Pakistan</i>	0	1	1
	<i>S. Bellevue</i>	0	1	1
	not identified	1	4	5
	Total O8	2 2.3% 95% CI 0.3–8.2	14 13.6% 95% CI 7.6–21.7	16 8.5% 95% CI 4.9–13.4

O-group	Serovar	Number of strains isolated from		
		human	pork	Total
9	<i>S. Enteritidis</i>	8	0	8
	<i>S. Wangata</i>	0	1	1
	not identified	2	1	3
	Total O9	10 11.6% 95% CI 5.7–20.4	2 1.9% 95% CI 0.2–6.8	12 6.4% 95% CI 3.3–10.8
13	<i>S. Myrria</i>	0	1	1
16	<i>S. Hvitittingfoss</i>	1	0	1
18	<i>S. Cotia</i>	0	1	1
	<i>Salmonella</i> II	0	1	1
	Total other groups	1 1.2% 95% CI 0.03–6.3	3 2.9% 95% CI 0.6–8.3	4 2.1% 95% CI 0.6–5.3
TOTAL		86	103	189

Note. *Differences are statistically significant.

PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf). For the category “resistant to fluoroquinolones”, the following breakpoints (zone of inhibition) were used: pefloxacin < 24 mm; and nalidixic acid < 16 mm.

Results

Salmonella strains belonged to several O-groups (Table 1): O4 (B) — 75 strains (39.7%); O3,10 (E) — 52 strains (27.5%); O7 (C₁) — 30 (15.9%); O8 (C₂) — 16 (8.5%); O9 (D) — 12 (6.3%); and to rare groups — 4 strains (2.1%). Some differences in serogroup spectrum were revealed in strains isolated from humans versus those from pork items as presented in Fig.

Strains isolated from humans predominantly belonged to group O4 (69.8%). The percentages of other serogroups varied from 1.2% (rare groups) to 11.6% (O9). About half of strains isolated from pork (44.7%) belonged to serogroup O3,10 (versus 7.0% in strains from humans). Serogroups O7, O4, and O8 were less frequent (22.3%, 14.6% and 13.6%, respectively). Single strains from pork belonged to serogroups

O9, O13, and O18. It is worth mentioning the obvious difference in proportions of serogroup O4 and O9 in strains isolated from pork (14.6% and 1.9%, respectively) versus those from humans (69.7% and 11.6%, respectively).

The studied *Salmonella* strains were resistant (about 80%) to antibiotics from different antimicrobial groups. More than half of strains (52.4%) had MDR to 3 or more antimicrobial groups (Table 2). For the majority of antimicrobials tested, there was no significant difference in the proportion of resistant strains (resistant/overall) in terms of sample source (humans, pork).

Up to 70.0% of strains were resistant to tetracycline. About half of strains were resistant to pefloxacin, ampicillin, and chloramphenicol. About 40% were resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole and nalidixic acid. However, it's worth mentioning that in pork strains none featured resistance to amoxicillin/clavulanic acid, ceftazidime and amikacin. The proportion of strains resistant to ceftriaxone and gentamycin, in those from humans versus those from pork, were significantly different: 12.8% vs 1.0%; and

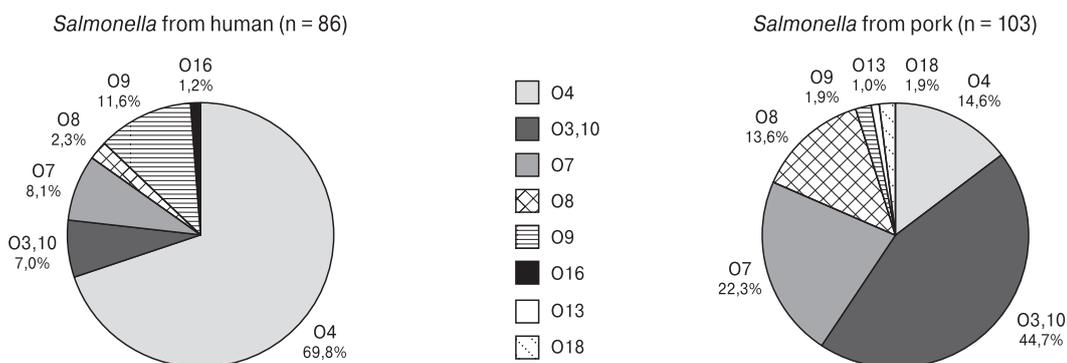


Figure. Serogroup pattern of *Salmonella* spp. isolated from humans and pork in southern provinces of Vietnam

Table 2. Antimicrobial susceptibility and resistance of *Salmonella* spp. isolated from different sources in southern provinces of Vietnam

Resistance phenotype	Isolated from						Total (n = 189)		
	human (n = 86)			pork (n = 103)			n	%	95% CI
	n	%	95% CI	n	%	95% CI			
Susceptible	13	15.1	8.3–24.5	28	27.2	18.9–36.8	41	21.7	16.0–28.3
Resistant to 1 or more antibiotics	73	84.9	75.5–91.7	75	72.8	63.2–81.1	148	78.3	71.7–84.0
Resistant to:									
– ampicillin	50	58.1	47.0–68.7	39	37.9	28.5–48.0	89	47.1	39.8–54.5
– amoxicillin/clavulanic acid	2	2.3	0.3–8.2	0	0.0	0–2.9	2	1.1	0.1–3.8
– ceftriaxone	11	12.8**	6.6–21.7	1	1.0**	0.02–5.3	12	6.4	3.3–10.8
– ceftazidime	4	4.7	1.3–11.5	0	0.0	0–2.9	4	2.1	0.6–5.3
– pefloxacin	48	55.8	44.7–66.5	54	52.4	42.4–62.4	102	54.0	46.6–61.2
– nalidixic acid	35	40.7	30.2–51.8	36	35.0	25.8–45.0	71	37.6	30.6–44.9
– trimethoprim/sulfamethoxazole	38	44.2	33.5–55.3	42	40.8	31.2–50.9	80	42.3	35.2–49.7
– chloramphenicol	49	57.0	45.9–67.6	39	37.9	28.5–48.0	88	46.6	39.3–53.9
– tetracycline	58	67.4	56.5–77.2	69	67.0	57.0–75.9	127	67.2	60.0–73.8
– gentamycin	26	30.2**	20.8–41.1	2	1.9**	0.2–6.8	28	14.8	10.1–20.7
– amikacin	1	1.2	0.03–6.3	0	0.0	0–2.9	1	0.5	0.01–2.9
Resistant to 3 and more groups (MDR*):	54	62.8	51.7–73.0	45	43.7	33.9–53.8	99	52.4	45.0–59.7
– 3 groups	7	8.1	3.3–16.1	5	4.9	1.6–11.0	12	6.3	3.3–10.8
– 4 groups	13	15.1	8.3–24.5	17	16.5	9.9–25.1	30	15.9	11.0–21.9
– 5 groups	18	20.9	12.9–31.1	22	21.4	13.9–30.5	40	21.2	15.6–27.7
– 6 groups	13	15.1**	8.3–24.5	1	1.0**	0.02–5.3	14	7.4	4.1–12.1
– 7 groups	3	3.5	0.7–9.9	0	0.0	0–2.9	3	1.6	0.3–4.6

Note. *MDR — multidrug resistant; **differences are statistically significant.

30.2 vs 1.9%, respectively (Table 2). Noteworthy is the fact that 16.4% of *Salmonella* strains were resistant to pefloxacin, but susceptible to nalidixic acid. This indicates transferable resistance mechanisms to fluoroquinolones. All tested *Salmonella* strains were susceptible to carbapenems.

Multidrug resistant *Salmonella* strains were identified in samples both from humans and pork (62.8% and 43.7%, respectively) (Table 3). However, simultaneous resistance to 6 antimicrobials was detected much more frequently in *Salmonella* strains isolated from humans than in those isolated from pork (15.1% vs 1.0%, respectively).

In general, MDR was detected in 52.4% (n = 99) of *Salmonella* belonging to different serovars, but serovar *S. Typhimurium* represented the biggest proportion of MDR strains (36.4%, n = 36). The predominant MDR phenotype (AMP, TE, QN, C, SXT) was detected in 30.3% of MDR strains belonging to serovars *S. Typhimurium*, *S. Bredeney*, *S. Corvallis*, *S. Give*, *S. London*, *S. Rissen*, and *S. Meleagridis*. Most of these strains were isolated from pork samples.

Discussion

Our research results suggest that in southern provinces of Vietnam, *Salmonella* strains isolated from people predominantly belonged to serogroup O4 (about 70.0%). The proportion of strains belonging to other serogroups (13–15 serovars) was

much lower, varying from 1.2% to 11.6%. The spectrum of *Salmonella* strains isolated in Vietnam differs significantly from that in Russia, where more than 70.0% of strains isolated from humans belong to serogroup O9 (*S. Enteritidis*) [8]. The difference likely results from the Vietnamese tradition of consuming sea food, which is frequently contaminated by *Salmonella* strains of a broad spectrum serovars (such as *S. Weltevreden*, *S. Senftenberg*, *S. Rissen*, *S. Lexington*, *S. Saintpaul*, *S. Newport*, *S. Albany*, *S. Anatum*, and others). About a half of strains isolated from pork belonged to serogroup O3,10, whereas 35 *Salmonella* serovars were isolated in total.

Our data are consistent with results of other studies. Analysis of raw meat samples, taken in markets and supermarkets in different cities and provinces of Vietnam, revealed a high level of *Salmonella* contamination: 58.3% of beef samples; up to 70.0% of pork; up to 65.0% of chicken meat; up to 50.0% of cultured shrimp; and 37.0% of cultured fish. The serovar spectrum varied from 14 to 53: *S. Weltevreden*, *S. Rissen*, *S. Anatum*, *S. London*, *S. Derby*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Reading*, *S. Agona*, *S. Dabou*, *S. Albany*, *S. Emek*, and *S. Corvallis* [22, 26].

The difference in serogroup spectrum of strains isolated in Vietnam from human and pork samples can likely also be explained by gastronomic (food cooking) traditions in Vietnamese society where sea-food, poultry meat, and eggs are considered the main factor in transmission of *Salmonella* to humans.

Table 3. MDR phenotypes of *Salmonella* isolated from different sources in southern provinces of Vietnam

Resistance phenotypes (antibiotic groups ¹)	Strains isolated from				Total n
	human		pork		
	n	serovars	n	serovars	
Resistant to 3 groups	7		5		12
TE, QN, SXT	0	–	2	group O:7 S. Djugu	2
TE, QN, C	1	S. Typhimurium	0	–	1
TE, C, SXT	0	–	1	S. Anatum	1
TE, AMG, QN	1	S. Stanley	0	–	1
AMP, TE, SXT	0	–	1	S. Rissen	1
AMP, TE, QN	5	group O:3,10 group O:8 S. Typhimurium	1	group O:9	6
Resistant to 4 groups	13		17		30
TE, QN, C, SXT	4	S. Newport S. Saintpaul S. Stanley S. Typhimurium	6	group O:4 group O:7 S. Anatum	10
TE, AMG, QN, C	1	S. Typhimurium	0	–	1
AMP, TE, QN, SXT	0	–	3	group O:4 S. Bonn	3
AMP, TE, QN, C	1	S. Typhimurium	2	S. Derby S. Gatow	3
AMP, TE, C, SXT	3	group O:7 S. Stanley	4	group O:3,10 S. Eingedi S. Epicrates S. Myrria	7
AMP, TE, AMG, C	1	S. Typhimurium	0	–	1
AMP, QN, C, SXT	2	S. Saintpaul S. Typhimurium	1	group O:3,10	3
AMP, C3–4, QN, C	1	group O:3,10	0	–	1
AMP, AMG, QN, C	0	–	1	S. Typhimurium	1
Resistant to 5 groups	18		22		40
TE, AMG, QN, C, SXT	2	S. Typhimurium	0	–	2
AMP, TE, QN, C, SXT	8	group O:3,10 S. Heidelberg S. Rissen S. Stanley S. Typhimurium	22	group O:7 S. Bredeney S. Corvalis S. Give S. London S. Meleagridis S. Rissen S. Typhimurium	30
AMP, TE, AMG, QN, C	1	S. Typhimurium	0	–	1
AMP, TE, AMG, C, SXT	2	S. Typhimurium	0	–	2
AMP, C3–4, TE, QN, C	4	S. Choleraesuis S. Typhimurium	0	–	4
AMP, AMG, QN, C, SXT	1	group O:7	0	–	1
Resistant to 6 groups	13		1		14
AMP, TE, AMG, QN, C, SXT	12	S. Enteritidis S. Larochelle S. Typhimurium	1	S. Give	13
AMP, C3–4, TE, AMG, QN, C	1	S. Typhimurium	0	–	1
Resistant to 7 groups	3		0		3
AMP, C3–4, QN, TE, C, AMG, SXT	3	group O:9 S. Typhimurium	0	–	3
TOTAL MDR strains	54		45	–	99

Note. MDR — multidrug resistant. 1 Antibiotic groups: AMP — aminopenicillins (ampicillin); C3–4 — cephalosporins of 3–4 generations (ceftriaxone, ceftazidime); CARB — carbapenems (meropenem); QN — quinolones (nalidixic acid, pefloxacin); AMG — aminoglycosides (gentamycin, amikacin); TE — tetracyclines (tetracycline); C — phenicols (chloramphenicol); SXT — trimethoprim/sulfamethoxazole.

Our research results suggest that more than 70.0% of *Salmonella* strains (isolated both from human and pork samples in Vietnam) were resistant to antimicrobials. Moreover, every second strain carried an MDR phenotype. The research revealed quite a high percentage of strains resistant to tetracycline (67.2%), fluoroquinolones (54.0%), ampicillin (47.1%), trimethoprim/sulfamethoxazole (42.3%), and chloramphenicol (46.6%). Strains resistant to 3rd/4th generation cephalosporins were seen (6.4%). Our results don't contradict earlier published research carried out in Vietnam [16, 17, 18, 19, 22, 23, 25, 26, 27, 28]. Similar research carried out in Russia has suggested that: more than 60% of local *Salmonella* strains are resistant to quinolones; not more than 10.0% are resistant to "old" antimicrobials (tetracycline, chloramphenicol, ampicillin); and less than 2.0% are resistant to 3rd/4th generation cephalosporins. The percentage of MDR strains was much lower (about 15.0%) versus that in Vietnamese strains [4].

In February 2017, the WHO published a list of antibiotic-resistant "priority pathogens" listing 12 bacterial species as the most threatening to human health [29]. *Salmonella* resistant to fluoroquinolones (until recently having been considered first line medicines for salmonellosis treatment) are now in a highly prioritized group together with such agents as *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Neisseria*

gonorrhoeae, *Helicobacter pylori*, and *Campylobacter* spp. In our study, half of the isolated *Salmonella* belonged to this highly prioritized group of resistant bacteria.

The appearance of *Salmonella* producing extended spectrum β -lactamase (ESBL) makes the empiric usage of extended spectrum cephalosporins (ESC) restricted for salmonellosis treatment. In conformity with published data in Russia, the percentage of such strains (in serovars *S. Virchow*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport*) is 0.2–10.0%. There have been detected ESBL belonging to such genetic groups as CTX-M and AmpC cephalosporinases [4, 5]. In our study, cephalosporin-resistant strains (6.4%) were mainly isolated from humans. They belonged to *S. Typhimurium* (group O4), with some strains of group O3,10.

The resistance to fluoroquinolones and cephalosporins observed, simultaneous with the loss of *Salmonella* susceptibility to "old" antimicrobials (ampicillin, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole), crucially restrict the list of medicines potent to treat complicated salmonellosis. Antimicrobial usage in raising of farm livestock may account for the appearance of resistant *Salmonella* strains and their spread to humans. As such, resistance restriction requires prevention of resistance formation in strains circulating in farm livestock.

References

1. Андреева И.В., Стецюк О.У. Отпуск без проблем: современные подходы к профилактике и лечению диареи путешественников // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018. Т. 20, № 3. С. 172–180. [Andreeva I.V., Stetsiouk O.U. Current approaches to prophylaxis and treatment of travelers' diarrhea. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2018, vol. 20, no. 3, pp. 172–180. (In Russ.)] doi: 10.36488/cmasc.2018.3.172-180
2. Гончар Н.В., Лазарева И.В., Рычкова С.В., Кветная А.С., Альшаник Л.П., Фомичева Ю.В., Ныркова О.И., Кириленко Л.А. Заболеваемость детей сальмонеллезом и уровень резистентности клинических штаммов сальмонелл к антибактериальным препаратам в Санкт-Петербурге // Журнал инфектологии. 2015. Т. 7, № 1. С. 80–86. [Gonchar N.V., Lazareva I.V., Rychkova S.V., Kvetnaja A.S., Al'shanik L.P., Fomicheva J.V., Nyrkova O.I., Kirilenko L.A. Child morbidity of salmonellosis and the level of resistance of clinical isolates of *Salmonella* to antibacterial preparations in Saint Petersburg. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2015, vol. 7, no. 1, pp. 80–86. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2015-7-1-80-86
3. Евмененкова И.Г., Мурач Л.В. Анализ резистентности штаммов *Salmonella* spp. к антибиотикам в Смоленском регионе за 2012–2017 гг. // Смоленский медицинский альманах. 2018. № 1. С. 93–96. Evmenenko I.G., Murach L.V. Analysis of resistance of strains of *Salmonella* spp. to antibiotics in the Smolensk gerion for 2012–2017. *Smolenskii meditsinskii al'manakh = Smolensk Medical Almanac*, 2018, no. 1, pp. 93–96. (In Russ.)
4. Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Сужаева Л.В., Забровская А.В., Войтенкова Е.В., Матвеева З.Н., Останкова Ю.В., Лихачев И.В., Сатосова Н.В., Кицбашвили Р.В., Смирнова Е.В., Семченкова Л.И., Быстрая Т.Е., Сокольник С.Е., Уткина Н.П., Сихандо Л.Ю. Устойчивость к антимикробным препаратам и клинически значимые механизмы резистентности штаммов *Salmonella*, выделенных в 2014–2018 гг. в Санкт-Петербурге, Россия // Клиническая лабораторная диагностика. 2019. Т. 64, № 10. С. 620–626. [Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Suzhaeva L.V., Zabrovskaja A.V., Voitenkova E.V., Matveeva Z.N., Ostankova Y.V., Likhachev I.V., Satosova N.V., Kitsbabashvili R.V., Smirnova E.V., Semchenkova L.I., Bystraya T.E., Sokol'nik S.E., Utkina N.P., Sikhando L.Y. Antimicrobial resistance and clinical significant resistance mechanisms of *Salmonella* isolated in 2014–2018 in Saint Petersburg, Russia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2019, vol. 64, no. 10, pp. 620–626. (In Russ.)] doi: 10.18821/0869-2084-2019-64-10-620-626
5. Забровская А.В., Егорова С.А., Антипова Н.А., Смирнова Е.В., Семченкова Л.И., Быстрая Т.Е., Сокольник С.Е., Уткина Н.П., Сихандо Л.Ю., Сатосова Н.В. Чувствительность к антибиотикам сальмонелл-доминирующих сероваров, выделенных в Северо-Западном федеральном округе РФ в 2004–2018 гг. из различных источников // Журнал инфектологии. 2022. Т. 14, № 1. С. 131–139. [Zabrovskaja A.V., Egorova S.A., Antipova N.A., Smirnova E.V., Semchenkova L.I., Bystraya T.E., Sokol'nik S.E., Utkina N.P., Sikhando L.Y., Satosova N.V. Antimicrobial susceptibility of dominant *Salmonella* serovars, isolated in North-West federal district in 2004–2018 from different sources. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2022, vol. 14, no. 1, pp. 131–139. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2022-14-1-131-139

6. Козлов С.Н., Козлов Р.С. Современная антимикробная химиотерапия: руководство для врачей. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2017, 400 с. [Kozlov S.N., Kozlov R.S. Modern antimicrobial chemotherapy: a guide-lines for doctors. Moscow: LLC "Medical Information Agency", 2017, 400 p. (In Russ.)]
7. Кузнецова Н.А., Соловьева А.С., Раков А.В. Чувствительность к антибиотикам у штаммов Salmonella Enteritidis, циркулирующих на территории Сибири и Дальнего Востока, по данным многолетнего мониторинга // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2018. Т. 3. С. 50–58. [Kuznetsova N.A., Solovyeva A.S., Rakov A.V. Antibiotic resistance of Salmonella Enteritidis strains, circulated in territory of the siberia and far east, at multi-year monitoring. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka = Health. Medical Ecology. Science*, 2018, no. 3, pp. 50–58. (In Russ.)] doi: 10.5281/zenodo.1488030
8. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. 256 с. [On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in Russia in 2020: State Report. Moscow: Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, 2021, 256 p.] URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/5fa/gd-seb_02.06-_s-podpisyu_.pdf
9. Anders K.L., Thompson C.N., Thuy N.T., Nguyet N.M., Tu le T.P., Dung T.T., Phat V.V., Van N.T., Hieu N.T., Tham N.T., Ha P.T., Lien le B., Chau N.V., Baker S., Simmons C.P. The epidemiology and aetiology of diarrhoeal disease in infancy in southern Vietnam: a birth cohort study. *Int. J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 35, pp. 3–10. doi: 10.1016/j.ijid.2015.03.013
10. Centers for Disease Control and Prevention. Yellow Book, 2020. Chapter 2. Travelers' Diarrhea. URL: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/preparing-international-travelers/travelers-diarrhea> (02.07.21)
11. Echeita M.A., Herrera S., Garaizar J., Usera M.A. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common Salmonella second-phase flagellar antigens. *Res. Microbiol.*, 2002, vol. 153, no. 2, pp. 107–113. doi: 10.1016/s0923-2508(01)01295-5
12. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 2018, vol. 16, no. 12: e05500. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5500
13. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2022. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA Journal*, 2022, vol. 20, no. 3: e07209. doi: 10.2903/j.efsa.2022.7209
14. Herrera-León S., McQuiston J.R., Usera M.A., Fields P.I., Garaizar J., Echeita M.A. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of Salmonella spp. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 6, pp. 2581–2586. doi: 10.1128/JCM.42.6.2581-2586.2004
15. Huyen D.T.T., Hong D.T., Trung N.T., Hoa T.T.N., Oanh N.K., Thang H.V., Thao N.T.T., Hung D.M., Iijima M., Fox K., Grabovac V., Heffelfinger J., Batmunkh N., Anh D.D. Epidemiology of acute diarrhea caused by rotavirus in sentinel surveillance sites of Vietnam, 2012–2015. *Vaccine*, 2018, vol. 36, no. 51, pp. 7894–7900. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.05.008
16. Huynh T.T.A., Khai L.T.L. The prevalence and antibiotic resistance of Salmonella spp. isolated from pigs and farm environments in vinh long province. *Can Tho University Journal of Science*, 2018, vol. 54, special issue: Agriculture, pp. 26–33. doi: 10.22144/CTU.JSI.2018.091
17. Lettini A.A., Vo Than T., Marafin E., Longo A., Antonello K., Zavagnin P., Barco L., Mancin M., Cibin V., Morini M., Dang Thi Sao M., Nguyen Thi T., Pham Trung H., Le L., Nguyen Duc T., Ricci A. Distribution of Salmonella serovars and antimicrobial susceptibility from poultry and swine farms in Central Vietnam. *Zoonoses Public Health*, 2016, vol. 63, pp. 569–576. doi: 10.1111/zph.12265
18. Nhung N.T., Van N., Cuong N.V., Duong T., Nha, T.T., Hang T., Nhi N., Kiet B.T., Hien V.B., Ngoc P.T., Campbell J., Thwaites G., Carrique-Mas J. Antimicrobial residues and resistance against critically important antimicrobials in non-typhoidal Salmonella from meat sold at wet markets and supermarkets in Vietnam. *Int. J. Food Microbiol.*, 2018, vol. 266, pp. 301–309. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.015
19. Noor Uddin G.M., Larsen M.H., Barco L., Minh Phu T., Dalsgaard A. Clonal occurrence of Salmonella weltevreden in cultured shrimp in the Mekong delta, Vietnam. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 7: e0134252. doi: 10.1371/journal.pone.0134252
20. Phu Huong Lan N., Le Thi Phuong T., Nguyen Huu H., Thuy L., Mather A.E., Park S.E., Marks F., Thwaites G.E., Van Vinh Chau N., Thompson C.N., Baker S. Invasive non-typhoidal Salmonella infections in Asia: clinical observations, disease outcome and dominant serovars from an infectious disease hospital in Vietnam. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2016, vol. 10, no. 8: e0004857. doi: 10.1371/journal.pntd.0004857
21. Riddle M.S., DuPont H.L., Bradley A., Connor B.A. ACG Clinical Guideline: diagnosis, treatment, and prevention of acute diarrheal infections in adults. *Am. J. Gastroenterol.*, 2016, vol. 111, no. 5, pp. 602–622. doi: 10.1038/ajg.2016.126
22. Ta Y.T., Nguyen T.T., To P.B., Pham da X., Le H.T., Thi G.N., Alali W.Q., Walls I., Doyle M.P. Quantification, serovars, and antibiotic resistance of salmonella isolated from retail raw chicken meat in Vietnam. *J. Food Prot.*, 2014, vol. 77, no. 1, pp. 57–66. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-221
23. Tai D.T. Circulation of extended-spectrum β -lactamase producing Salmonella isolated from food handler in Lam Dong provinces. 2nd International Conference on Clinical Microbiology & Microbial Genomics, September 16–17, 2013. *Hampton Inn Tropicana, Las Vegas, NV, USA*.
24. Thompson C.N., Phan V.T., Le T.P., Pham T.N., Hoang L.P., Ha V., Nguyen V.M., Pham V.M., Nguyen T.V., Cao T.T., Tran T.T., Nguyen T.T., Dao M.T., Campbell J.I., Nguyen T.C., Tang C.T., Ha M.T., Farrar J., Baker S. Epidemiological features and risk factors of Salmonella gastroenteritis in children resident in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Epidemiol. Infect.*, 2013, vol. 141, no. 8, pp. 1604–1613. doi: 10.1017/S0950268812002014
25. Trung N.V., Carrique-Mas J.J., Nghia N.H., Tu L.T., Mai H.H., Tuyen H.T., Campbell J., Nhung N.T., Nhung H.N., Minh P.V., Chieu T.T., Hieu T.Q., Mai N.T., Baker S., Wagenaar J.A., Hoa N.T., Schultsz C. Non-typhoidal Salmonella colonization in chickens and humans in the Mekong delta of Vietnam. *Zoonoses Public Health*, 2017, vol. 64, no. 2, pp. 94–99. doi: 10.1111/zph.12270
26. Thai T.H., Hirai T., Lan N.T., Yamaguchi R. Antibiotic resistance profiles of Salmonella serovars isolated from retail pork and chicken meat in North Vietnam. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, vol. 156, no. 2, pp. 147–151. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.016

27. Tu L.T., Hoang N.V., Cuong N.V., Campbell J., Bryant J.E., Hoa N.T., Kiet B.T., Thompson C., Duy D.T., Phat V.V., Hien V.B., Thwaites G., Baker S., Carrique-Mas J.J. High levels of contamination and antimicrobial-resistant non-typhoidal Salmonella serovars on pig and poultry farms in the Mekong delta of Vietnam. *Epidemiol. Infect.*, 2015, vol. 143, no. 14, pp. 3074–3086. doi: 10.1017/S0950268815000102
28. Van T.T., Moutafis G., Tran L.T., Coloe P.J. Antibiotic resistance in food-borne bacterial contaminants in Vietnam. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, no. 24, pp. 7906–7911. doi: 10.1128/AEM.00973-07
29. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. News Release 27.02.2017. URL: <http://www.who.int/ru/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Авторы:

Егорова С.А., д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Чуонг К.Н., исследователь лаборатории кишечных инфекций отдела микробиологии и иммунологии Института Пастера в г. Хо Ши Мин, г. Хо Ши Мин, Социалистическая Республика Вьетнам;

Кафтырева Л.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Кожухова Е.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории хронических вирусных инфекций НИЦ при кафедре инфекционных болезней и эпидемиологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Макарова М.А., д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Куонг К.Х., к.м.н., зам. директора Института Пастера в г. Хо Ши Мин, г. Хо Ши Мин, Социалистическая Республика Вьетнам;

Ву Х.Н., зав. лабораторией кишечных инфекций отдела микробиологии и иммунологии Института Пастера в г. Хо Ши Мин, г. Хо Ши Мин, Социалистическая Республика Вьетнам;

Хуонг Т.З., исследователь лаборатории кишечных инфекций отдела микробиологии и иммунологии Института Пастера в г. Хо Ши Мин, г. Хо Ши Мин, Социалистическая Республика Вьетнам;

Лан Т.К.Ч., зав. отделом ветеринарных наук факультета животноводства и ветеринарии Университета сельского и лесного хозяйства, г. Хо Ши Мин, Социалистическая Республика Вьетнам;

Чам К.В., зав. лабораторией здоровья животных и терапевтическим отделом Департамента животноводства и ветеринарии, г. Хо Ши Мин, Социалистическая Республика Вьетнам;

Лонг Т.Н., сотрудник Департамента животноводства и ветеринарии, г. Хо Ши Мин, Социалистическая Республика Вьетнам;

Диеп Т.Н.Н., сотрудник Департамента животноводства и ветеринарии, г. Хо Ши Мин, Социалистическая Республика Вьетнам;

Ту Л.К.Б., сотрудник лаборатории здоровья животных и терапевтического отдела Департамента животноводства и ветеринарии, г. Хо Ши Мин, Социалистическая Республика Вьетнам;

Тху Л.К.Н., сотрудник лаборатории здоровья животных и терапевтического отдела Департамента животноводства и ветеринарии, г. Хо Ши Мин, Социалистическая Республика Вьетнам

Authors:

Egorova S.A., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Truong Q.N., MSc (Biotechnology), Researcher, Laboratory of Enteric Infections, Department of Microbiology and Immunology, Pasteur Institute in Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam;

Kaftyreva L.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Kozhukhova E.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Chronic Viral Infection Laboratory of the Research Center (Branch of the Infectious Diseases and Epidemiology Department), Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Makarova M.A., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Medical Microbiology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Cuong Q.H., PhD (Medicine), Deputy Director, Pasteur Institute in Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam;

Vu H.N., MSc (Biology), Head of the Laboratory of Enteric Infections, Department of Microbiology and Immunology, Pasteur Institute in Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam;

Huong T.D., BSc (Biotechnology), Researcher, Laboratory of Enteric Infections, Department of Microbiology and Immunology, Pasteur Institute in Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam;

Lan T.Q.T., PhD, MSc, D.V.M., Head and Lecturer, Department of Veterinary Biosciences, University of Agriculture and Forestry (Nong Lam University), Ho Chi Minh, Vietnam;

Tram K.V., MSc, Dr (Medicine), Head of the Laboratory of Animal Health and Treatment Division, Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Ho Chi Minh City, Vietnam;

Long T.N., MSc (Biotechnology), Member of Staff, Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam;

Diep T.N.N., MSc, Dr (Veterinarian), Member of Staff, Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam;

Tu L.K.B., Dr (Veterinarian), Member of Staff, Animal Health Laboratory and Treatment Division, Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam;

Thu L.K.N., Dr (Veterinarian), Member of Staff, Animal Health Laboratory and Treatment Division, Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam.

НОВЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*

М.Л. Леденева, Г.А. Ткаченко, И.Б. Захарова

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия

Резюме. *Burkholderia pseudomallei* является возбудителем мелиоидоза — тяжелого инфекционного заболевания людей и животных, которое может длительное время не проявлять себя и быстро развиваться до пневмонии и септицемии при снижении иммунитета и наличии предрасполагающих факторов. Мелиоидоз эндемичен для стран с тропическим и субтропическим климатом, где *B. pseudomallei* входит в состав микробиоты почвы и воды стоячих водоемов, а также ризосферы растений. Регистрация завозных случаев мелиоидоза в странах умеренного климатического пояса наряду с сохранением угрозы использования данного патогена в качестве агента биотерроризма свидетельствуют об актуальности исследований, направленных на разработку современных методов диагностики и типирования этого патогена. Тенденцией современных исследований при проведении внутривидовой дифференциации штаммов возбудителей инфекционных заболеваний является использование двух и более типов молекулярных маркеров. Перспективным направлением для генотипирования штаммов *B. pseudomallei* является использование комбинации VNTR-локусов, обеспечивающей высокую дискриминирующую способность метода мультилокусного анализа числа варибельных tandemных повторов (MLVA), в сочетании с медленно эволюционирующими единичными нуклеотидными полиморфизмами (SNPs). Целью настоящей работы было выявление новых VNTR- и SNP-локусов, пригодных для использования в качестве генетических маркеров в молекулярном типировании возбудителя мелиоидоза. Объектами исследования служили 20 штаммов *B. pseudomallei* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и полногеномные последовательности 85 штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank NCBI. При типировании штаммов возбудителя мелиоидоза из базы данных GenBank NCBI по 4 VNTR-локусам выявлено 74 генотипа, из которых 64 были уникальными (индекс Хантера–Гастона 0,997). Установлено, что высокий аллельный полиморфизм VNTR-локусов ограничивал возможность с помощью схемы MLVA-4 определять географические и филогенетические связи изолятов *B. pseudomallei*, а выявленные нуль-аллели увеличивали риск возникновения гомоплазии. В связи с этим схему MLVA-4 дополнили VNTR-маркером в составе локуса BPSS1974, кодирующего коллагеноподобный белок, и SNP-маркерами в генах лауроилацилтрансферазы биосинтеза липида-А, сигма-фактора RpoH РНК-полимеразы и глутаминамидотрансферазы. Для амплификации выбранных локусов в составе разработанной схемы сконструированы праймеры и зонды, которые апробированы при типировании коллекционных штаммов *B. pseudomallei*. По результатам кластерного анализа 105 штаммов возбудителя мелиоидоза оптимальным оказался комплексный подход, позволяющий на основании VNTR-профилей осуществлять дифференциацию штаммов внутри SNP-групп. Разработанный методический подход к генетическому ти-

Адрес для переписки:

Леденева Маргарита Леонтьевна
400131, Россия, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7,
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора.
Тел.: 8 905 330-27-63.
E-mail: volresin@yandex.ru

Contacts:

Margarita L. Ledenyova
400131, Russian Federation, Volgograd, Golubinskaya str., 7,
Volgograd Plague Control Research Institute.
Phone: +7 905 330-27-63.
E-mail: volresin@yandex.ru

Для цитирования:

Леденева М.Л., Ткаченко Г.А., Захарова И.Б. Новые генетические маркеры для типирования штаммов *Burkholderia pseudomallei* // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1091–1102. doi: 10.15789/2220-7619-NGM-1965

Citation:

Ledenyova M.L., Tkachenko G.A., Zakharova I.B. New genetic markers for burkholderia pseudomallei strains typing // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1091–1102. doi: 10.15789/2220-7619-NGM-1965

пированию *B. pseudomallei*, основанный на комплексном анализе 4 SNP- и 5 MLVA-маркеров в нашей модификации, дает возможность дифференцировать штаммы в соответствии с географическими регионами их происхождения и устанавливать клональное происхождение изолятов при выявлении случаев мелиоидоза.

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, генотипирование, MLVA, SNPs, филогеография, тандемные повторы.

NEW GENETIC MARKERS FOR *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* STRAINS TYPING

Ledenyova M.L., Tkachenko G.A., Zakharova I.B.

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation

Abstract. *Burkholderia pseudomallei* is the causative agent of melioidosis, a serious infectious disease in humans and animals that may be asymptomatic long-term and quickly develop to pneumonia and septicemia in immunocompromised state and due to predisposing factors. Melioidosis is endemic in countries with tropical and subtropical climates, where *B. pseudomallei* is a part of the soil and water microbiota of stagnant water bodies, as well as the plant rhizosphere. The recording of imported melioidosis cases in countries with temperate climate zone, along with the continued threat of using this pathogen as a bioterrorism agent, indicate the relevance of research aimed at developing modern methods for its diagnosing and typing. Current research in the intraspecific differentiation of pathogenic strains of infectious diseases tends to use two or more types of molecular markers. A promising direction for the *B. pseudomallei* strains genotyping is based on using a combination of VNTR loci, which provides a high discriminating ability of the method of multi-locus variable tandem repeat number analysis (MLVA), and slowly evolving single nucleotide polymorphisms (SNPs). The aim of this work was to identify new VNTR and SNP loci suitable for use as genetic markers in molecular typing of the melioidosis causative agent. 20 strains of *B. pseudomallei* from the collection of the Volgograd Plague Control Research Institute and whole genome sequences of 85 *B. pseudomallei* strains from the GenBank NCBI database were analyzed. While typing melioidosis causative agent strains from the GenBank NCBI database for 4 VNTR loci, 74 genotypes were identified, of which 64 were unique (Hunter–Gaston index 0.997). It was found that the high allelic polymorphism of VNTR loci limited a potential to determine the geographical and phylogenetic relationships of *B. pseudomallei* isolates by using the MLVA-4 scheme, and the identified null alleles increased the risk of homoplasia. In this regard, the MLVA-4 scheme was supplemented with a VNTR marker in the BPSS1974 locus encoding a collagen-like protein as well as with SNP markers in the genes of lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase, RNA polymerase sigma factor RpoH, and glutamine amidotransferase. For amplification of the select loci, primers and probes were designed as part of the developed scheme, which were tested in the typing of *B. pseudomallei* collection strains. According to the results of a cluster analysis for 105 strains of the melioidosis causative agent, an integrated approach turned out to be optimal, allowing differentiation of strains within SNP groups based on VNTR profiles. The methodological approach developed for *B. pseudomallei* genetic typing, based on a comprehensive analysis of 4 SNP- and 5 MLVA-markers in our modification, allowed to differentiate strains according to the geographical regions of their origin and establish the clonal origin of isolates upon revealing cases of melioidosis.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, genotyping, MLVA, SNPs, phylogeography, tandem repeats.

Введение

Burkholderia pseudomallei является этиологическим агентом мелиоидоза — особо опасного заболевания людей и животных с высокой летальностью. По оценочным данным в мире от мелиоидоза ежегодно погибает около 89 000 человек [15]. В настоящее время эндемичными по мелиоидозу признано около 50 стран, расположенных между 30-ми параллелями всех континентов, и этот список продолжает пополняться. Возможный занос с эндемичных территорий возбудителей редких инфекционных заболеваний является актуальной проблемой общественного здравоохранения.

В связи с высокой вирулентностью, низкой инфицирующей дозой и отсутствием эффективных вакцин возбудитель мелиоидоза включен в список потенциальных агентов биотерроризма как в Российской Федерации, так и за ру-

бежом, что определяет необходимость развития технологий молекулярного типирования для определения клонального происхождения изолятов [1, 12, 24].

Востребованным подходом для оценки генетического разнообразия штаммов *B. pseudomallei* является метод мультилокусного анализа числа переменных тандемных повторов — MLVA (Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis), основанный на использовании переменных по копияности микро- и минисателлитных повторов (Variable Number Tandem Repeats, VNTRs) [4, 25]. Подбор переменных локусов и определение их количества в схеме типирования являются критическими для оценки результатов анализа. При этом увеличение количества анализируемых VNTR-локусов может приводить к выявлению уникальных аллелей, которые скорее будут оценивать не популяционно-генетическую изменчивость, а ва-

риабельность самого маркера. Так, предложенная J.M. U'Ren и соавт. [23] 32-локусная схема MLVA-типирования дифференцирует близкородственные штаммы, включая последовательные изоляты от одного больного, что может повлечь получение искаженных данных, например, при определении характера вспышки и ее наиболее вероятного источника. С другой стороны, сокращение схем MLVA-типирования снижает дискриминирующую способность метода, в результате чего возрастает вероятность получения схожих профилей у неродственных штаммов в результате гомоплазии.

Проблема гомоплазии актуальна и при проведении мультилокусного сиквенс-типирования (Multilocus Sequence Typing, MLST), поскольку характерная для *B. pseudomallei* высокая частота рекомбинационных событий может приводить к единообразию сиквенс-типов (sequence type, ST) изолятов, несмотря на их генетическую и географическую гетерогенность [3].

Тенденцией современных исследований по внутривидовому типированию микроорганизмов является использование двух и более типов молекулярных маркеров, что повышает достоверность результатов исследования. В частности, перспективным представляется дополнение схемы MLVA анализом медленно эволюционирующих единичных нуклеотидных полиморфизмов (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs).

Целью данной работы являлось выявление новых VNTR- и SNP-локусов, пригодных для использования в качестве генетических маркеров в молекулярном типировании *B. pseudomallei*.

Материалы и методы

Объектами исследования служили 20 штаммов возбудителя мелиоидоза из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (табл. 1) и полногеномные последовательности 85 штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).

Экстракцию нуклеиновых кислот из предварительно обеззараженных в соответствии с МУ 1.3. 2569-09 суспензий клеток (10^8 м.к/мл) штаммов *B. pseudomallei* проводили с использованием коммерческого набора реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), согласно инструкции производителя.

Для проведения мультилокусного VNTR-анализа штаммов *B. pseudomallei* по 4-локусной схеме (S389k, S1788k, L933k и L2341k) использовали олигонуклеотидные праймеры и условия ам-

плификации, предложенные в работе V.J. Currie и соавт. [6]. MLVA-генотип исследуемых штаммов *B. pseudomallei* определяли как совокупность аллельных вариантов каждого локуса и представляли в виде числового паттерна количества повторов по локусам S389k-S1788k-L933k-L2341k. Амплификацию тандемных повторов в составе дополнительного локуса BPSS1974 проводили с помощью разработанных ранее праймеров Burk0090s (5'-ATCGCAATCGGCA TTTCCACCC-3') и Burk0090as (5'-GTGGCGG AGACGACGGTGC-3') при следующих параметрах: 95°C — 10 мин, 40 циклов (94°C — 10 с, 66°C — 20 с, 72°C — 45 с), 72°C — 5 мин [2].

Для определения однонуклеотидных полиморфизмов методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) разработаны праймеры и TaqMan-зонды, нуклеотидные последовательности которых указаны в табл. 2. Амплификацию локусов с однонуклеотидными полиморфизмами проводили на термоциклере роторного типа «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия) с детекцией флуоресценции по каналам FAM/Green и JOE/Yellow после каждой стадии элонгации. SNP-профиль штаммов *B. pseudomallei* представляли как последовательность нуклеотидов в каждом из четырех локусов — (SNP1-SNP2-SNP3-SNP4).

Нуклеотидные последовательности полученных ампликонов определяли методом капиллярного электрофореза с помощью генетического анализатора «ABI 3130 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США).

Поиск кандидатных маркерных локусов проводили *in silico* путем множественного выравнивания и сравнительного анализа фрагментов геномов штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank NCBI с помощью модуля MUSCLE программы Unipro UGENE v40.0 [17]. Дизайн олигонуклеотидов осуществляли с использованием программного обеспечения Primer3Plus [22] и «OLIGO v6.71» (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, США).

Кластерный анализ и построение дендрограмм проводили при помощи программ FAMD v1.31 [19] и Mega v11.0.11 [21] с использованием коэффициента генетической дистанции Жаккарда (GD_{Jaccard}) и алгоритма объединения ближайших соседей (Neighbor-Joining, NJ). Для оценки вариабельности генетических локусов рассчитывали индекс аллельного полиморфизма (h) [20]. Дискриминирующую способность методов молекулярного типирования определяли на основании расчета индекса Хантера–Гастона (HGDI) [13].

При проведении *in silico* мультилокусного сиквенс-типирования штаммов *B. pseudomallei* из GenBank NCBI использовали базу данных

PubMLST (<https://pubmlst.org/bpseudomallei>). Группы изолятов, сиквенс-типы которых являлись одно- и двухлокусными вариантами (single- and double-locus variants, SLV/DLV), объединяли в клональные комплексы (clonal complexes, CC) с помощью алгоритма goeBURST (<https://www.phyloviz.net/goeburst>).

Результаты

Типирование 85 штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank NCBI по схеме MLVA-4 распределило исследованные штаммы по 74

MLVA-типам, 10 из которых включали от двух до трех штаммов и 64 были представлены одним изолятом. По данным MLST среди этих же штаммов обнаружено 57 различных сиквенс-типов, причем 22 из них являлись SLV с образованием 6 клональных комплексов (рис. 1А).

При сопоставлении MLST- и MLVA-профилей определены четыре группы штаммов *B. pseudomallei*. В первые две группы были распределены штаммы с общими сиквенс-типами и имеющие в пределах каждого ST идентичные MLVA-профили (группа ST/MLVA-I) и близкие MLVA-профили, отличающиеся по одному

Таблица 1 Штаммы *B. pseudomallei*, использованные в работе

Table 1. *B. pseudomallei* strains used in the study

Штаммы <i>B. pseudomallei</i> Strains of <i>B. pseudomallei</i>	Источник выделения Selection source	Место и год выделения Place and year of isolation
Tchad 97	больной человек, кровь sick person, blood	Чад, Африка, 1978 Chad, Africa, 1978
Iran Terre 98	больной человек, кровь sick person, blood	Иран, 1978 Iran, 1978
Dalat 100	больной человек, кровь sick person, blood	Далат, Центральный Вьетнам, 1978 Dalat, Central Vietnam, 1978
PI 54 107	нет данных no data	Дания, Копенгаген, 1983 Denmark, Copenhagen, 1983
Pearce 110	больной человек, кровь sick person, blood	Австралия, 1983 Australia, 1983
Skamandri 113	больной человек, мокрота больной человек, sputum	Австралия, 1983 Australia, 1983
128	нет данных no data	Австралия, 1986 Australia, 1986
131	клинический изолят clinical isolate	Таиланд, 1985 Thailand, 1985
132	клинический изолят clinical isolate	Таиланд, 1985 Thailand, 1985
134	клинический изолят clinical isolate	Таиланд, 1985 Thailand, 1985
136	клинический изолят clinical isolate	Таиланд, 1985 Thailand, 1985
51274	больной человек, гнойные абсцессы sick person, purulent abscesses	Вьетнам, 1950 Vietnam, 1950
56738	больной человек, кровь sick person, blood	Вьетнам, 1950 Vietnam, 1950
56770	больной человек, моча sick person, urine	Вьетнам, 1950 Vietnam, 1950
56812	больной человек, кровь sick person, blood	Вьетнам, 1950 Vietnam, 1950
57562	больной человек, гной сустава sick person, joint pus	Вьетнам, 1950 Vietnam, 1950
59361	гной яичка свиньи pig testicle pus	Южный Вьетнам, 1962 South Vietnam, 1962
59426	больной человек, кровь sick person, blood	Вьетнам, 1950 Vietnam, 1950
61503	больной человек, гной подкожного абсцесса sick person, subcutaneous abscess pus	Вьетнам, 1962 Vietnam, 1962
C-141 (CIP 6068)	больной человек, кровь sick person, blood	Сайгон, Вьетнам, 1948 Saigon, Vietnam, 1948

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, сконструированных для определения однонуклеотидных полиморфизмов

Table 2. Nucleotide sequences of primers and probes designed to detect single nucleotide polymorphisms

Локус/Условное обозначение SNPs Locus/Symbol of the SNPs	Наименование праймеров/ зонда Primers/Probe name	Нуклеотидная последовательность (5'→3') Nucleotide sequence (5'→3')
BPSL0211/ SNP1	<i>BpsSNP1s</i> <i>BpsSNP1as</i> <i>BpsSNP1prC</i> <i>BpsSNP1prT</i>	AATCGGGAAAGCAGAGTTG CGTTTCTCAAATTCCTCGC (FAM)-CTCGGCTGGCTGCTCTATCgGATCCCC-(BHQ) (HEX)-CTCGGCTGGCTGCTCTATCaGATCCCC-(BHQ)
BPSL0211/ SNP2	<i>BpsSNP2s</i> <i>BpsSNP2as</i> <i>BpsSNP2prC</i> <i>BpsSNP2prT</i>	CGAGGAATTTGAGAAACGC GACGGAGGATTCGCATG (FAM)-CGTCTCGGCACACgGCTTGC-(BHQ) (HEX)-CGTCTCGGCACACaGCTTGC-(BHQ)
BPSL0504/ SNP3	<i>BpsSNP3s</i> <i>BpsSNP3as</i> <i>BpsSNP3prC</i> <i>BpsSNP3prT</i>	CATCTTCTTCATCGCGCT TATCTCGCCGATTCGCAC (HEX)-AATCGCTCGACGcGCGAGCCGC-(BHQ) (FAM)-AATCGCTCGACGCaCGAGCCGC-(BHQ)
BPSL3430/ SNP4	<i>BpsSNP4s</i> <i>BpsSNP4as</i> <i>BpsSNP4prC</i> <i>BpsSNP4prT</i>	ATCAACTGCGAGCCGAGA CAGTTTCGAGCAGGTGCT (HEX)-CGTCGTCGGATACAGCcCGTCGTCGT-(BHQ) (FAM)-CGTCGTCGGATACAGctCGTCGTCGT-(BHQ)

Примечание. Вариабельные нуклеотиды обозначены строчными буквами.

Note. Variable nucleotides are indicated by lowercase letters.

локусу не более чем на два повтора (группа ST/MLVA-II). Штаммы одного ST, но различающиеся по двум и более VNTR-локусам, были отнесены в группу ST/MLVA-III. Четвертая группа являлась наиболее гетерогенной и включала штаммы, которые в соответствии с их сиквенс-типами объединены в клональные комплексы (ST/MLVA-IV).

В первую группу вошли штаммы с профилем ST975/(4-7-11-2) — MSHR5864 и MSHR6755 (Австралия, 2011 и 2012 гг.); ST126/(3-8-12-9) — MSHR435 и MSHR491 (Австралия, 1996 и 1997 гг.); ST1001/(4-5-3-9) — vgh16R и vgh16W (Тайвань, 2001 г.).

Во вторую группу были включены 11 штаммов, которым соответствовало 4 различных профиля ST/(S389k-S1788k-L933k-L2341k). При этом в трех случаях межштаммовые различия в пределах одного профиля обусловлены вариабельным числом повторов по локусу L933k: ST36/(3-7-8/7-3) — MSHR0305, MSHR520, MSHR3763 и MSHR4083 (Австралия, 1994, 1998 и 2010 гг.); ST553/(6-4-5/3-8) — MSHR5848 и MSHR5855 (Австралия, 2011 г.); ST667/(8-6-6/7-8) — A79A и B03 (Папуа — Новая Гвинея, 2011 г.). Штаммы с сиквенс-типом ST617 различались на 1 повтор по локусу S389k и были представлены профилем ST617/(5/6-9-2-6) — MSHR146, MSHR0511 и NAU20B-16 (Австралия, 1992, 1997 и 2007 гг.).

У штаммов группы ST/MLVA-III по результатам VNTR-типирования выявлена вариабельность числа повторов в каждом из четырех локусов. MLVA-профили штаммов 1106a и 1106b

(Таиланд, 1993 и 1996 гг.) отличались на три повтора по локусу L2341k и имели генотип ST70/(4-6-13-11/8), а отштамма BPC006 (Китай, 2008 г.) дополнительно по локусу S389k — ST70/(3-6-13-5). Штаммы MSHR5858 (Австралия, 2011 г.) и 350105 (Китай, 1976 г.), принадлежавшие к сиквенс-типу ST562, отличались по трем VNTR-локусам (6/8-8-8/11-10/11). Вариабельность MLVA-генотипов австралийских штаммов MSHR1435 и MSHR1655 (2002 и 2003 гг. соответственно), относящихся к сиквенс-типу ST131, обусловлена локусами S389k и S1788k — (4/0-8/9-5-6).

Группу ST/MLVA-IV составили 36 штаммов *B. pseudomallei* 22 сиквенс-типов, распределенных по 6 клональным комплексам. В наибольший по численности клональный комплекс (CC92) вошел 21 штамм *B. pseudomallei* сиквенс-типов ST92, ST95, ST12, ST10, ST518, ST1038, ST297, ST436, ST951 и ST698. В результате MLVA-типирования по 4 вышеназванным VNTR-локусам выявлена принадлежность штаммов CC92 к четырем крупным MLVA-кластерам (A, B, E и J), внутри которых штаммы дифференцировались на группы генотипов. При значении генетической дистанции 0,4 выявлено 11 таких групп — A1, A2, A3, A4, A5, B1, B3, E1, E2, J1 и J3 (рис. 1A).

Анализ результатов MLVA-типирования штаммов клонального комплекса CC92 показал, что сформированные группы в ряде случаев связаны с географическим происхождением штаммов. Так, в группу B1 вошли изолированные от домашних игуан в 2007 и 2013 гг.

в Калифорнии штаммы *B. pseudomallei* 2002734728 и 2013746777 с идентичным VNTR-профилем (6-6-9-2) и отличающиеся от них по локусам S389k и L933k штаммы 2010007509 (Аризона, 2009 г.) и 2011756189 (Швейцария, 2010 г.). При этом штаммы 2010007509 и 2011756189 отличались только по локусу L933k (9-6-8/10-2) и были выделены от больных людей, инфицированных

при посещении Коста-Рики и Мартиники соответственно [10, 11]. Принадлежность штаммов *B. pseudomallei* 2002734728, 2013746777 и 2010007509 к общему сиквенс-типу (ST518) и тот факт, что большинство игуан для торговли США импортируют из Центральной Америки, дают основания предполагать общность происхождения штаммов данной группы.

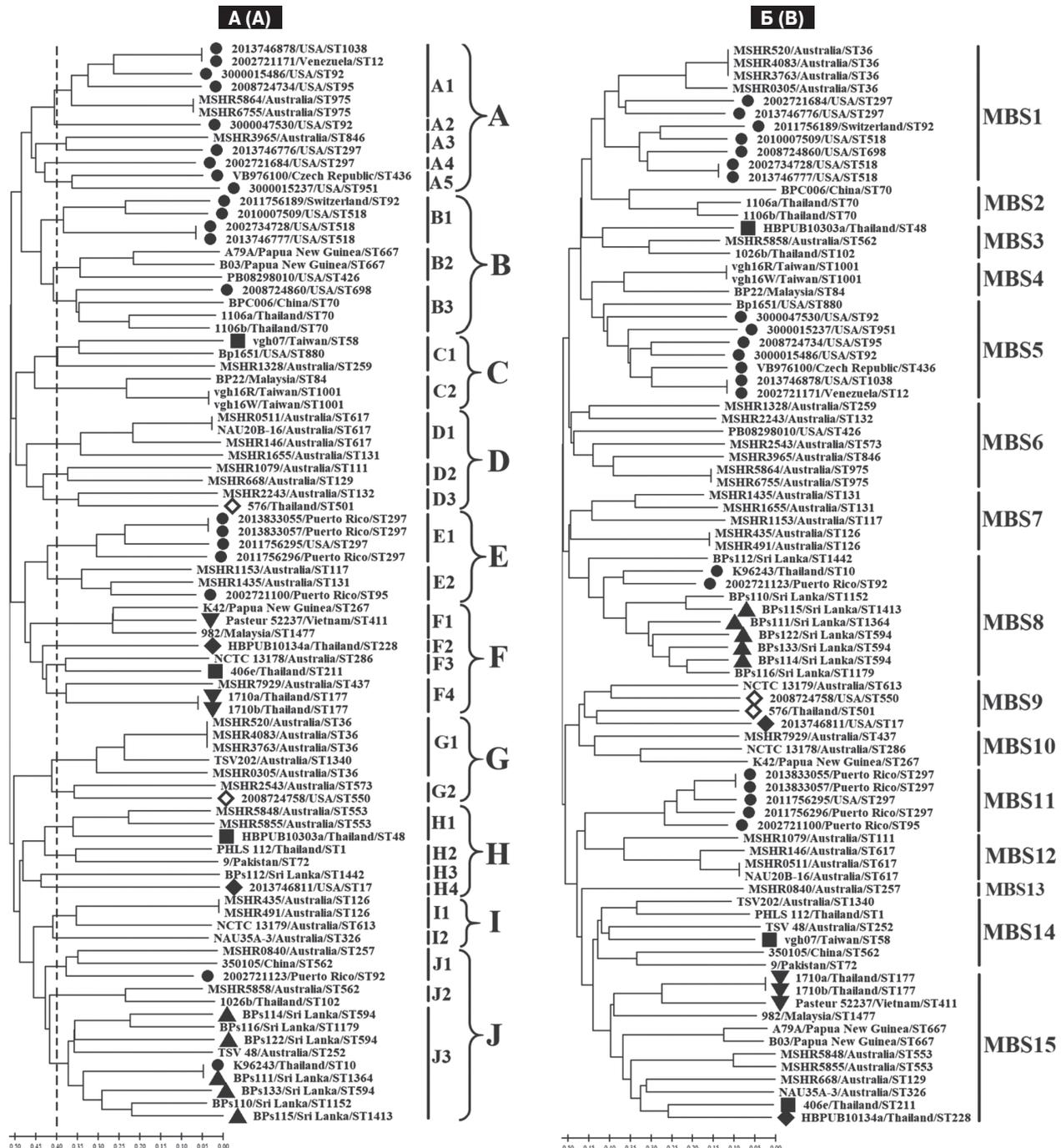


Рисунок 1. Сравнительный анализ результатов типирования 85 штаммов *B. pseudomallei* с помощью схемы MLVA-4 (А) и сочетанного использования схемы MLVA-4, локуса BPSS1974^{#1} и SNP1-4 (Б)

Figure 1. Comparative analysis of 85 *B. pseudomallei* strains typing by using the MLVA-4 scheme (A) as well as combined use of the MLVA-4 scheme, the BPSS1974^{#1} locus, and SNP1-4 (B)

Примечание. Штаммы одного клонального комплекса отмечены одинаковыми пиктограммами.

Note. Same clonal complex strains are denoted with similar pictograms.

В группу A1 по результатам MLVA-4 анализа объединены штаммы возбудителя мелиоидоза, выделенные в Венесуэле (*B. pseudomallei* 2002721171) и от больных людей в США, посещавших Гватемалу (*B. pseudomallei* 2013746878) и Мексику (*B. pseudomallei* 2008724734 и 3000015486). При этом штаммы из Венесуэлы и Гватемалы имели идентичный VNTR-профиль (5-5-11-2) и отличались по локусу S389k от штамма *B. pseudomallei* 3000015486 (4-5-11-2), а от штамма *B. pseudomallei* 2008724734 дополнительно по локусу L933k (4-5-15-2). Несмотря на близость VNTR-профилей, все штаммы из этой группы принадлежали к разным сиквенс-типам (ST12, ST1038, ST95, ST92).

Все штаммы группы E1 относились к сиквенс-типу ST297. В нее вошли клинический и два почвенных штамма, выделенные в Пуэрто-Рико, а также один штамм от пациента в США, посещавшего Республику Тринидад и Тобаго. Почвенные штаммы *B. pseudomallei* 2013833055 и 2013833057 имели одинаковый VNTR-профиль (4-10-12-6), который отличался от профилей клинических штаммов по локусам L933k и L2341k: *B. pseudomallei* 2011756296 (4-10-9-6) и *B. pseudomallei* 2011756295 (4-10-12-3).

К группе A5 с VNTR-профилем (6/8-5-16/19-2) были отнесены штаммы *B. pseudomallei* VB976100 (ST436) и 3000015237 (ST951), выделенные соответственно от зеленой игуаны в Праге и от больного человека в США, посещавшего Мексику.

Остальные штаммы клонального комплекса CC92, отнесенные по результатам VNTR-типирования к MLVA-кластерам A, B и E, были представлены на дендрограмме отдельными ветвями (A2, A4) или формировали общие группы со штаммами других сиквенс-типов (A3, B3 и E2). Вместе с тем два других штамма этого клонального комплекса — *B. pseudomallei* 2002721123 и K96243 — вошли в состав дистанцированного MLVA-кластера J. При этом в группу J3 наряду со штаммом *B. pseudomallei* K96243 были объединены 7 штаммов возбудителя мелиоидоза, выделенные в 2015 г. от больных людей в Шри-Ланке, в том числе 5 штаммов клонального комплекса (ST1364-ST594-ST1413). Для штаммов из других 4 клональных комплексов явной взаимосвязи VNTR-профилей с географическим происхождением выявлено не было.

Вариабельность VNTR-профилей у исследованных штаммов *B. pseudomallei* в ряде случаев была обусловлена не только копийностью мотива в составе минисателлитного локуса, но и INDELL-мутациями в составе коровой единицы. Так, аллельные варианты локусов S389k, L933k и L2341k у выделенных в 2015 г. в Шри-Ланке клинических изолятов обусловлены делециями нуклеотидов. При этом штамм *B. pseudomallei* BPs112 в результате делеции

трех нуклеотидов в коровой единице локуса L933k был отнесен к MLVA-кластеру H, в составе которого сформировал отдельную ветвь с *B. pseudomallei* 2013746811 (США, 2013 г.).

Анализ аллельного полиморфизма продемонстрировал высокую вариабельность локусов L933k и L2341k, для которых установлено наличие 20 ($h = 0,906$) и 16 аллелей ($h = 0,877$) соответственно. Локусы S389k ($h = 0,799$) и S1788k ($h = 0,825$) были представлены 10 вариантами каждый. Значение индекса Хантера–Гастона составило 0,997, что демонстрирует очень высокую разрешающую способность метода.

Полученные данные свидетельствуют о широком диапазоне аллельного разнообразия и высокой скорости мутирования VNTR-локусов, что ограничивает возможность схемы MLVA-4 для определения географических и филогенетических связей изолятов возбудителя мелиоидоза. В связи с этим был проведен поиск более консервативных локусов, включение которых в схему MLVA-4 позволит добиться большей точности в определении степени генетического родства изучаемых штаммов.

В качестве такого VNTR-маркера выбран минисателлит-содержащий регион в составе локуса BPSS1974 штамма *B. pseudomallei* K96243, аннотированного в базе данных GenBank NCBI как ген коллагеноподобного белка. Обнаруженный регион был обозначен как BPSS1974^{#1} и представлял собой вырожденный 9-нуклеотидный мотив $(TCX_1GGX_2ACX_3)_n$, где $X_1/X_2/X_3$ — вариабельные нуклеотидные позиции, n — число повторов. Мутации типа транзиций и трансверсий в положениях X_1 , X_2 и X_3 мотива соответствовали третьим позициям кодонов, кодирующих пептид $(Ser-Gly-Thr)_n$ и не приводили к замене аминокислот ($dN/dS = 0$), что свидетельствует о действии стабилизирующего отбора. У проанализированных 85 штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank NCBI в соответствии с копийностью мотива в составе локуса BPSS1974^{#1} выявлено 20 аллельных вариантов ($h = 0,8$).

В качестве кандидатных SNP-маркеров выбраны последовательности генов лауроилацилтрансферазы биосинтеза липида-A [Gene ID: 3093529 (BPSL0211)] — обозначены нами как SNP1 и SNP2; сигма-фактора RpoH РНК-полимеразы [Gene ID: 3094670 (BPSL0504)] — обозначен как SNP3; глутаминамидотрансферазы [Gene ID: 3091795 (BPSL3430)] — обозначен как SNP4 (табл. 2). Типирование этой же выборки штаммов с использованием предлагаемого набора однонуклеотидных полиморфизмов выявило 13 SNP-паттернов.

Сравнение генетических профилей по локусам BPSS1974^{#1} и SNP1–4 показало их идентичность у всех штаммов, принадлежащих одному сиквенс-типу и имеющих общий регион

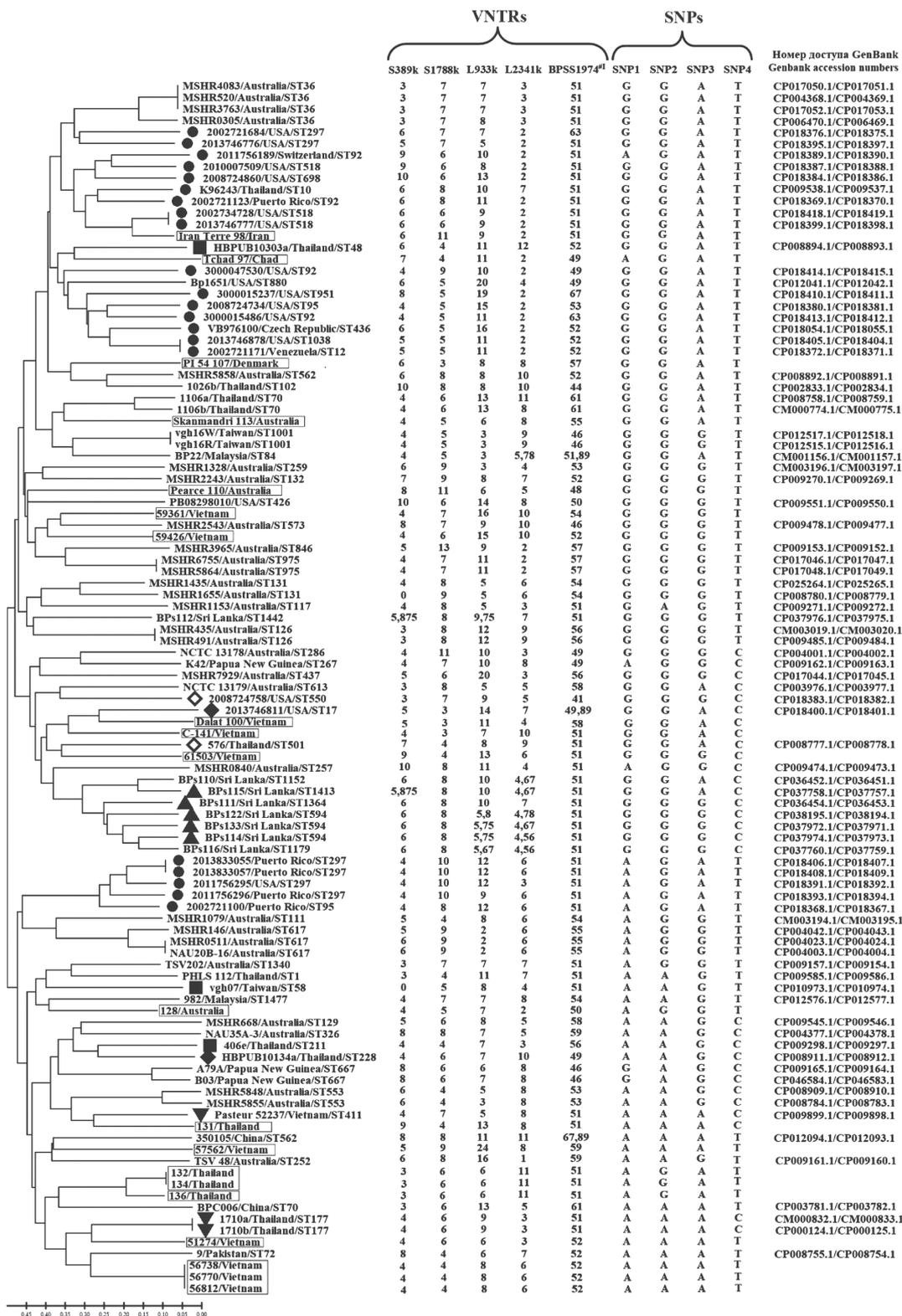


Рисунок 2. Дендрограмма, построенная с помощью алгоритма Neighbor-Joining, по результатам типирования 105 штаммов *B. pseudomallei* с использованием данных комплексного анализа на основе молекулярных маркеров 5 VNTR- и 4 SNP-локусов

Figure 2. Dendrogram constructed by using the Neighbor-Joining algorithm based on the results of 105 *B. pseudomallei* strains typing with complex analysis data using molecular markers of 5 VNTR and 4 SNP loci

Примечание. Штаммы одного клонального комплекса отмечены одинаковыми пиктограммами. Рамками обозначены штаммы из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.
Note. Same clonal complex strains are denoted with similar pictograms. The strains from the collection of the Volgograd Plague Control Research Institute are depicted in boxes.

выделения. Штаммы из одного клонального комплекса обладали по предлагаемым локусам идентичными или близкими профилями. Так, на основании полученных паттернов штаммы *B. pseudomallei* 1710a и 1710b (Таиланд, 1996 г. и 1999 г.) и *B. pseudomallei* Pasteur 52237 (Вьетнам, 1964 г) клонального комплекса ST177-ST411, отличающиеся по схеме MLVA-4 по трем VNTR-локусам, отнесены к одному генотипу. Штаммы клонального комплекса ST1364-ST594-ST1413, изолированные от больных людей на Шри-Ланке, также обладали идентичными профилями по локусам BPSS1974^{#1} и SNP1-4 за исключением *B. pseudomallei* BPs115, который отличался по локусу SNP3.

У штаммов клонального комплекса CC92 установлено шесть аллельных вариантов по локусу BPSS1974^{#1} и два SNP профиля, различающиеся по локусу SNP1 — (G/A-G-A-T). При этом SNP-профиль (A-G-A-T) был обнаружен только у почвенных и клинических штаммов, выделенных в Пуэрто-Рико (*B. pseudomallei* 2013833055, 2013833057, 2011756296 и 2002721100), а также от посещавших соседние острова туристов (*B. pseudomallei* 2011756295 и 2011756189). Аллельный вариант локуса BPSS1974^{#1} с числом повторов 52 выявлен среди штаммов CC92 только у *B. pseudomallei* 2013746878, 2002721171 и VB976100, что наряду с идентичным SNP-профилем (G-G-A-T) позволило выделить их в отдельную группу.

Интересно, что штаммы *B. pseudomallei* 1106a, 1106b (Таиланд) и BPC006 (Китай) группы ST/MLVA-III, принадлежащие к ST70, имели в локусе BPSS1974^{#1} 61 повтор, но отличались по локусам SNP1 и SNP2 в зависимости от региона выделения: для штаммов из Таиланда установлен SNP-профиль (G-G-A-T), а из Китая — (A-A-A-T). Необходимо отметить, что SNP-профиль (A-A-A-T) обнаружен всего у трех штаммов исследованной выборки, выделенных в соседних Китае у *B. pseudomallei* BPC006 (ST70) и 350105 (ST562) и Пакистане — *B. pseudomallei* 9 (ST72), причем ST562 и ST72 представляли собой двухлокусные варианты друг друга, тогда как ST70 отличался по всем аллелям.

Дополненная локусами BPSS1974^{#1} и SNP1-4 схема MLVA-4, обозначенная как MBS (MLVA-4, BPSS1974^{#1}, SNP1-4), позволила более точно разделить штаммы *B. pseudomallei* в соответствии с регионом их происхождения (рис. 1Б). Так, штаммы клонального комплекса CC92 были распределены по четырем отдельным кластерам с определенной географической приуроченностью. Наиболее крупные из них — MBS1 и MBS5 — объединяли штаммы из стран Центральной Америки, Мексики, Венесуэлы и островов Карибского бассейна, завезенные в США и Европу. Кластер MBS11 вклю-

чал штаммы из Пуэрто-Рико и Республики Тринидад и Тобаго. В самостоятельную ветвь внутри кластера MBS8 выделены штаммы *B. pseudomallei* 2002721123 (Пуэрто-Рико, 1998 г.) и K96243 (Таиланд, 1999 г.).

Штаммы из MLVA-кластера F по схеме MBS разделились на три разные группы, коррелирующие с их географическим происхождением и сиквенс-типами. Так, в отдельную группу выделены тайские штаммы *B. pseudomallei* 406e и HVPUB10134a, сиквенс-типы которых являлись двухлокусными вариантами. Штаммы 1710a, 1710b и Pasteur 52237 клонального комплекса ST177-ST411, изолированные в Таиланде и Вьетнаме, кластеризовались вместе с малазийским штаммом *B. pseudomallei* 982. При этом обе группы вошли в состав кластера MBS15, в то время как третья группа штаммов из Австралии (*B. pseudomallei* NCTC_13178 и MSHR7929) и Папуа — Новой Гвинеи (*B. pseudomallei* K42) сформировали отдельный кластер MBS10.

Применение схемы MBS позволило выделить штаммы из Австралии в три отдельных кластера — MBS6, MBS7 и MBS12, в каждом из которых штаммы имели идентичные SNP-профили, но отличались по VNTR-локусам. Исключение составил лишь клинический штамм *B. pseudomallei* MSHR1153, отличающийся от доминирующего генотипа кластера MBS7 по локусу SNP2. У трех штаммов кластера MBS6 (*B. pseudomallei* MSHR3965, MSHR5864 и MSHR6755) в локусе BPSS1974^{#1} идентифицировано одинаковое число повторов, что позволило выделить их в отдельную группу этого кластера.

Разработанная схема типирования была экспериментально апробирована на коллекционных штаммах *B. pseudomallei* различного географического происхождения (табл. 1).

На основании комплексного анализа VNTR- и SNP-локусов, входящих в состав предлагаемой схемы MBS, проведено типирование 105 штаммов возбудителя мелиоидоза, включая 20 коллекционных (рис. 2). При этом характер кластеризации 85 штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank NCBI сохранялся, что свидетельствует о применимости разработанного методического подхода для филогенетического анализа при проведении эпидемиологического расследования случаев заболевания.

Обсуждение

Молекулярное типирование возбудителя мелиоидоза осуществляется с применением ряда методов, заключающихся в анализе отдельных генетических локусов, их комплексов или определении полной последовательности геномов. Вместе с тем использование отдельных подхо-

дов или их сочетания требует осторожности, поскольку установленная для *B. pseudomallei* высокая частота гомологичной рекомбинации между штаммами может не отражать эволюционную историю отдельных генов [5, 16].

Сочетание филогенетической информативности однонуклеотидных полиморфизмов и дискриминирующей способности метода MLVA позволило разработать схему из 4 SNP- и 5 VNTR-локусов, обозначенную как MBS. Предложенная схема в большинстве случаев обеспечивает группирование штаммов возбудителя мелиоидоза в зависимости от общности их географического происхождения. Показательно, что штаммы *B. pseudomallei* из стран Западного полушария сформировали три группы, конкретизирующие регион их происхождения: в одну группу вошли штаммы из Пуэрто-Рико и Республики Тринидад и Тобаго, а две другие были представлены завозными случаями преимущественно из Мексики, Центральной Америки и островов Карибского бассейна. Подобное распределение штаммов *B. pseudomallei* показано в работе J.E. Gee и соавт. [10] на основании анализа SNP-полиморфизмов всего генома. Примечательно, что как на уровне полного генома, так и по 9 локусам предложенной схемы MBS, штаммы из Мексики обладают большим генетическим разнообразием в сравнении с пуэрториканскими.

В нашем исследовании штаммы *B. pseudomallei* 2002721171 (ST12) и 2013746878 (ST1038), выделенные соответственно в Венесуэле и от посетившего Гватемалу пациента из США, кластеризовались вместе со штаммом VB976100 (ST436) неизвестного происхождения, изолированного в Праге из абсцесса зеленой игуаны [8]. Ранее сиквенс-тип ST436 был идентифицирован только у двух штаммов из Центральной Америки (Гватемалы и Перу). В соответствии со схемой MBS *B. pseudomallei* 2013746878 и 2002721171 имели идентичный генотип и отличались от *B. pseudomallei* VB976100 только по локусам S389k и L933k, что свидетельствовало в пользу центральноамериканского происхождения штамма VB976100.

Связь образованных групп с географическим происхождением штаммов дает основание рассматривать схему MBS в качестве полезного инструмента при расследовании случаев мелиоидоза у пациентов с неясной историей путешествий в эндемичные стра-

ны. Так, штаммы *B. pseudomallei* 2008724758, PB08298010 и 2013746811 выделены от больных, никогда не выезжавших за пределы континентальной части США [7, 9, 18], тем не менее проведенное типирование показало происхождение этих штаммов за пределами Западного полушария [10].

Существенный интерес представляет перспективность использования схемы MBS для оценки генетического разнообразия *B. pseudomallei* на эндемичных территориях. Так, результаты проведенного нами генотипирования штаммов, выделенных во время вспышки мелиоидоза в восточной части Шри-Ланки в 2015 г., полностью соответствовали результатам полногеномного анализа H.S. Jayasinghearachchi и соавт. [14].

Одной из проблем при проведении генотипирования является скрытый полиморфизм, обусловленный отсутствием продукта амплификации. Так, в ходе исследования выявлено отсутствие VNTR-локуса S389k у *B. pseudomallei* MSHR1655 (ST131), изолированного от больного в Австралии, который по схеме MLVA-4 кластеризовался с австралийскими штаммами ST617, выделенными из объектов окружающей среды. Вместе с тем при сравнении аллельных профилей по трем остальным локусам схемы MLVA-4 установлено, что VNTR-профиль MSHR1655 отличался на три повтора по локусу L933k от штаммов ST617, а от почвенного изолята MSHR1435 того же ST131, выделенного в Австралии годом ранее — на один повтор по локусу S1788k. Включение в схему MLVA-4 дополнительных молекулярных маркеров позволило выделить штаммы MSHR1655 и MSHR1435 в отдельную кластерную группу на основе идентичности их профилей по локусам BPSS1974^{#1} и SNP1–4.

Таким образом, предложен комплексный подход для типирования *B. pseudomallei*, позволяющий на основании MLVA-профилей осуществлять дифференциацию штаммов *B. pseudomallei* внутри SNP-групп, что может рассматриваться как эффективный способ для установления филогеографических взаимосвязей штаммов. Разработанный методический подход к генетическому типированию *B. pseudomallei*, основанный на сочетанном анализе SNP- и MLVA-маркеров, позволяет дифференцировать штаммы в соответствии с географическими регионами их происхождения и устанавливать клональность случаев мелиоидоза.

Список литературы/References

1. Онищенко Г.Г., Топорков А.В., Липницкий А.В., Викторов Д.В. Проблемы противодействия биологическому терроризму на современном этапе // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. 2016. Т. 1, № 14. С. 24–31. [Onishchenko G.G., Toporkov A.V., Lipnitsky A.V., Viktorov D.V. Problems of counteraction to biological terrorism at the present stage. *Infektsionnye bolezni: Novosti. Mneniya. Obuchenie* = *Infectious Diseases: News. Opinions. Training*, 2016, vol. 1, no. 14, pp. 24–31. (In Russ.)]

2. Патент № 2545702 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68 (2006.01). Олигонуклеотидные праймеры Burk0090s/Burk0090as для оценки адаптационной изменчивости генома патогенных буркхолдерий: № 2013135429/10; заявлено 2013.07.26; опубликовано 10.04.2015. Бюл. № 10 / Савченко С.С., Ткаченко Г.А., Бондарева О.С., Шпак И.М., Леденева М.Л., Антонов В.А. Патентообладатель: Федеральное казенное учреждение здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 7 с. [Patent No. 2545702 Russian Federation, Int. Cl. C12Q 1/68 (2006.01). Oligonucleotide primers Burk0090s/Burk0090as for assessment of adaptive variability of genome of pathogenic burkholderia. No. 2013135429/10; application: 2013.07.26; date of publication 10.04.2015 / Savchenko S.S., Tkachenko G.A., Bondareva O.S., Shpak I.M., Ledeneva M.L., Antonov V.A. Proprietors: FSHE Volgograd Anti-Plague Institute of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare. 7 p.]
3. Aziz A., Sarovich D.S., Harris T.M., Kaestli M., McRobb E., Mayo M., Currie B.J., Price E.P. Suspected cases of intracontinental Burkholderia pseudomallei sequence type homoplasmy resolved using whole-genome sequencing. *Microb. Genom.*, 2017, vol. 3, no. 11: e000139. doi: 10.1099/mgen.0.000139
4. Baker A., Pearson T., Price E.P., Dale J., Keim P., Hornstra H., Greenhill A., Padilla G., Warner J. Molecular phylogeny of Burkholderia pseudomallei from a remote region of Papua New Guinea. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 3: e18343 doi: 10.1371/journal.pone.0018343
5. Challacombe J.F., Stubben C.J., Klimko C.P., Welkos S.L., Kern S.J., Bozue J.A., Worsham P.L., Cote C.K., Wolfe D.N. Interrogation of the Burkholderia pseudomallei genome to address differential virulence among isolates. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 12: e115951. doi: 10.1371/journal.pone.0115951
6. Currie B.J., Haslem A., Pearson T., Hornstra H., Leadem B., Mayo M., Gal D., Ward L., Godoy D., Spratt B.G., Keim P. Identification of melioidosis outbreak by multilocus variable number tandem repeat analysis. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, vol. 15, no. 2, pp. 169–174. doi: 10.3201/eid1502.081036
7. Doker T.J., Quinn C.L., Salehi E.D., Sherwood J.J., Benoit T.J., Glass Elrod M., Gee J.E., Shadomy S.V., Bower W.A., Hoffmaster A.R., Walke H.T., Blaney D.D., DiOrio M.S., Melioidosis Investigation Team. Fatal Burkholderia pseudomallei infection initially reported as a Bacillus species, Ohio, 2013. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2014, vol. 91, no. 4, pp. 743–746. doi: 10.4269/ajtmh.14-0172
8. Elschner M.C., Hnizdo J., Stamm I., El-Adawy H., Mertens K., Melzer F. Isolation of the highly pathogenic and zoonotic agent Burkholderia pseudomallei from a pet green Iguana in Prague, Czech Republic. *BMC Vet. Res.*, 2014, vol. 10: 283. doi: 10.1186/s12917-014-0283-7
9. Engelthaler D.M., Bowers J., Schupp J.A., Pearson T., Ginther J., Hornstra H.M., Dale J., Stewart T., Sunenshine R., Waddell V., Levy C., Gillice J., Price L.B., Contente T., Beckstrom-Sternberg S.M., Blaney D.D., Wagner D.M., Mayo M., Currie B.J., Keim P., Tuanyok A. Molecular investigations of a locally acquired case of melioidosis in Southern A.Z., USA. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2011, vol. 5, no. 10: e1347. doi: 10.1371/journal.pntd.0001347
10. Gee J.E., Gulvik C.A., Elrod M.G., Batra D., Rowe L.A., Sheth M., Hoffmaster A.R. Phylogeography of Burkholderia pseudomallei isolates, Western Hemisphere. *Emerg. Infect. Dis.*, 2017, vol. 23, no. 7, pp. 1133–1138. doi: 10.3201/eid2307.161978
11. Gétaz L., Abbas M., Loutan L., Schrenzel J., Iten A., Simon F., Decosterd A., Studer R., Sudre P., Michel Y., Merlani P., Emonet S. Fatal acute melioidosis in a tourist returning from Martinique Island, November 2010. *Euro Surveill.*, 2011, vol. 16, no. 1: 19758.
12. Gilad J., Harary I., Dushnitsky T., Schwartz D., Amsalem Y. Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei as bioterrorism agents: national aspects of emergency preparedness. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2007, vol. 9, no. 7, pp. 499–503.
13. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, vol. 26, no. 11, pp. 2465–2466. doi: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988
14. Jayasinghearachchi H.S., Francis V.R., Sathkumara H.D., Krishnananthasivam S., Masakorala J., Muthugama T., De Silva A.D., Corea E.M. Nonclonal Burkholderia pseudomallei population in melioidosis case cluster, Sri Lanka. *Emerg. Infect. Dis.*, 2021, vol. 27, no. 11, pp. 2955–2957. doi: 10.3201/eid2711.210219
15. Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P., Peacock S.J., Hay S.I. Predicted global distribution of Burkholderia pseudomallei and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.*, 2016, vol. 1: 15008. doi: 10.1038/nmicrobiol.2015.8
16. Nandi T., Ong C., Singh A.P., Boddey J., Atkins T., Sarkar-Tyson M., Essex-Lopresti A.E., Chua H.H., Pearson T., Kreisberg J.F., Nilsson C., Ariyaratne P., Ronning C., Losada L., Ruan Y., Sung W.K., Woods D., Titball R.W., Beacham I., Peak I., Keim P., Nierman W.C., Tan P. A genomic survey of positive selection in Burkholderia pseudomallei provides insights into the evolution of accidental virulence. *PLoS Pathog.*, 2010, vol. 6, no. 4: e1000845. doi: 10.1371/journal.ppat.1000845
17. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091
18. Sarovich D.S., Garin B., De Smet B., Kaestli M., Mayo M., Vandamme P., Jacobs J., Lompo P., Tahita M.C., Tinto H., Djaomalaza I., Currie B.J., Price E.P. Phylogenomic analysis reveals an Asian origin for African Burkholderia pseudomallei and further supports melioidosis endemicity in Africa. *mSphere*, 2016, vol. 1, no. 2: e00089-15. doi: 10.1128/mSphere.00089-15
19. Schluter P.M., Harris S.A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular. Ecology. Notes*, 2006, vol. 6, no. 2, pp. 569–572.
20. Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittam T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, vol. 51, no. 5, pp. 873–884. doi: 10.1128/aem.51.5.873-884.1986
21. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.*, 2021, vol. 38, no. 7, pp. 3022–3027. doi: 10.1093/molbev/msab120
22. Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R., Leunissen J.A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.*, 2007, vol. 35 (Web Server issue): W71–74. doi: 10.1093/nar/gkm306

23. U'Ren J.M., Schupp J.M., Pearson T., Hornstra H., Friedman C.L., Smith K.L., Daugherty R.R., Rhoton S.D., Leadem B., Georgia S., Cardon M., Huynh L.Y., DeShazer D., Harvey S.P., Robison R., Gal D., Mayo M.J., Wagner D., Currie B.J., Keim P. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. *BMC Microbiol.*, 2007, vol. 7: 23. doi: 10.1186/1471-2180-7-23
24. Wiersinga W.J., Currie B.J., Peacock S.J. Melioidosis. *N. Engl. J. Med.*, 2012, vol. 367, no. 11, pp. 1035–1044. doi: 10.1056/NEJMra1204699
25. Zhu X., Chen H., Li S., Wang L.C., Wu D.R., Wang X.M., Chen R.S., Li Z.J., Liu Z.G. Molecular characteristics of *Burkholderia pseudomallei* collected from humans in Hainan, China. *Front. Microbiol.*, 2020, vol. 11: 778. doi: 10.3389/fmicb.2020.00778

Авторы:

Леденева М.Л., научный сотрудник лаборатории генодиагностики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;
Ткаченко Г.А., к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории генодиагностики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;
Захарова И.Б., к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории патогенных буркхольдерий, г. Волгоград, Россия.

Authors:

Ledenyova M.L., Scientific Researcher of the Laboratory of Gene Diagnostics, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;
Tkachenko G.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Gene Diagnostics, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation
Zakharova I.B., PhD (Biology), Associate Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Pathogenic *Burkholderia*, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.05.2022
Принята к печати 11.06.2022

Received 30.05.2022
Accepted 11.06.2022

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА КЛЕЩЕЙ, НАПАДАЮЩИХ НА ЛЮДЕЙ В НОВОСИБИРСКЕ И ЕГО ПРИГОРОДАХ

М.Ю. Карташов^{1,2}, Е.И. Кривошеина¹, К.А. Свирин¹, Н.Л. Тупота¹, В.А. Терновой¹,
В.Б. Локтев^{1,2,3}

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

² ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

³ ФГБУН ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Юг Западной Сибири традиционно относится к регионам с неблагоприятной эпидемиологической обстановкой по инфекциям, переносимым клещами. В Новосибирске и его пригородах приблизительно 20 тыс. человек ежегодно обращаются за оказанием медицинской помощи после укуса клеща. Целью данной работы было определение видового состава клещей, атакующих человека на территории Новосибирска и его пригородов, путем определения нуклеотидной последовательности фрагментов митохондриального гена цитохромоксидазы COI клещей в течение весенне-летнего сезона 2018 г., определение инфицированности индивидуальных клещей возбудителями вирусных и бактериальных клещевых инфекций с генотипированием выявленных патогенов методами ПЦР с последующим определением нуклеотидных последовательностей и проведением филогенетического анализа секвенированных последовательностей для обнаруженных возбудителей клещевых инфекций. Установлено, что Новосибирском мегаполисе человека атакуют клещи пяти видов: *Ixodes persulcatus*, *Ixodes pavlovskyi*, *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor nuttali*. Подавляющее число нападений на человека приходится на клещей *I. pavlovskyi* (43,6%) и *D. reticulatus* (41,2%). В клещах, снятых с человека, выявлен генетический материал вируса клещевого энцефалита в 3,6% случаев, боррелий — 13,8% и риккетсий — 23,1%. Генотипирование вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в собранных клещах показало наличие сибирского генотипа в 83% случаев, а дальневосточного генотипа ВКЭ в 17% клещей. Вирус Кемерово обнаружить не удалось. Генетический материал боррелий и риккетсий был обнаружен во всех пяти видах клещей, атакующих местное население. Основная часть выявленных изолятов боррелий были отнесены к виду *Borrelia garinii* (86%) и 13% изолятов к *Borrelia afzelii*, а в одном клеще был обнаружен генетический материал *Borrelia miyamotoi*. У клещей рода *Dermacentor* обнаружен генетический материал *Rickettsia raoultii*, а клещи рода *Ixodes* в подавляющем числе случаев были инфицированы *Rickettsia tarasevichiae*. Причем в единичном экземпляре клеща *I. persulcatus* был найден генетический материал *Rickettsia helvetica*. Таким образом, население Новосибирска и его пригородов атакуют иксодовые клещи пяти видов с преобладающим

Адрес для переписки:

Карташов Михаил Юрьевич
630559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово, 6Б-61,
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.
Тел.: 8 923 419-31-92 (моб.). Факс: 8 (383) 336-74-09.
E-mail: mikkartash@yandex.ru

Contacts:

Mikhail Yu. Kartashov
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo, 6B-61,
State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector".
Phone: +7 923 419-31-92 (mobile). Fax: +7 (383) 336-74-09.
E-mail: mikkartash@yandex.ru

Для цитирования:

Карташов М.Ю., Кривошеина Е.И., Свирин К.А., Тупота Н.Л.,
Терновой В.А., Локтев В.Б. Генотипирование возбудителей клещевых
инфекций и определение видового состава клещей, нападающих
на людей в Новосибирске и его пригородах // Инфекция и иммунитет.
2022. Т. 12, № 6. С. 1103–1112. doi: 10.15789/2220-7619-GOT-1979

Citation:

Kartashov M.Yu., Krivosheina E.I., Svirin K.A., Tupota N.L., Ternovoi V.A.,
Loktev V.B. Genotyping of tick-borne pathogens and determination of human
attacking tick species in Novosibirsk and its suburbs // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6,
pp. 1103–1112. doi: 10.15789/2220-7619-GOT-1979

доминированием клещей *I. pavlovskyi* и *D. reticulatus*. В индивидуальных клещах, снятых с человека, обнаружен генетический материал следующих возбудителей клещевых инфекций: сибирского и дальневосточного генотипа ВКЭ, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. miyamotoi*, *R. raoulti*, *R. tarasevichiae* и *R. helvetica*.

Ключевые слова: иксодовые клещи, вирус клещевого энцефалита, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., генотипирование, ПЦР-диагностика.

GENOTYPING OF TICK-BORNE PATHOGENS AND DETERMINATION OF HUMAN ATTACKING TICK SPECIES IN NOVOSIBIRSK AND ITS SUBURBS

Kartashov M.Yu.^{a,b}, Krivosheina E.I.^a, Svirin K.A.^a, Tupota N.L.^a, Ternovoi V.A.^a, Loktev V.B.^{a,b,c}

^a State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

^b Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

^c FRC Institute of Cytology and Genetics the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The south of Western Siberia traditionally belongs to the regions with unfavorable epidemiological situation for tick-transmitted infections. In Novosibirsk and its suburbs, approximately 20 thousand people annually seek for medical care after tick bites. The purpose of this work was to determine human-attacking tick species composition in the territory of Novosibirsk and its suburbs by identifying nucleotide sequence of tick mitochondrial gene cytochrome oxidase COI fragment during the 2018 spring-summer season, determination of infections of individual ticks with viral and bacterial tick-borne infections, followed by genotyping identified pathogens by PCR methods, by determining nucleotide sequences and phylogenetic analysis. It is established that ticks of five species attack the humans: *Ixodes persulcatus*, *Ixodes pavlovskyi*, *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor nuttali* in the Novosibirsk metropolis. The majority of tick attacks on humans are associated with *I. pavlovskyi* (43.6%) and *D. reticulatus* (41.2%) ticks. The genetic material of the tick-borne encephalitis virus was detected in 3.6%, borrelia — 13.8% and *Rickettsia* — 23.1% individual ticks collected from humans. Genotyping of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in the collected ticks showed the presence of TBEV Siberian and Far Eastern genotype in 83% and 17% cases, respectively. The Kemerovo virus could not be detected. Genetic material from *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. has been detected in all five tick species attacking the local human population. The bulk of the identified *Borrelia* spp. isolates were genotyped as *Borrelia garinii* (86%) and 13% of the isolates as *Borrelia afzelii* species. The genetic material of *Borrelia miyamotoi* was found in one individual tick. Ticks of the genus *Dermacentor* have been found to be infected by *Rickettsia raoultii*, and ticks of the genus *Ixodes* were largely infected with *Rickettsia tarasevichiae*, and *I. persulcatus* tick was infected by *Rickettsia helvetica* in a single case. Thus, the human population of Novosibirsk and its suburbs is attacked by five species of ixodid ticks dominated by *I. pavlovskyi* and *D. reticulatus* ticks. The genetic material of the following tick-borne pathogens was found: Siberian and Far Eastern TBEV genotype, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. miyamotoi*, *R. raoulti*, *R. tarasevichiae* and *R. helvetica* in the individual ticks collected from humans.

Key words: ticks, tick-borne encephalitis virus, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., genotyping, PCR detection.

Введение

Иксодовые клещи являются переносчиками целого ряда инфекционных заболеваний вирусной, бактериальной и протозойной природы, играющих большую роль в инфекционной патологии человека. В России по поводу укусов клещей за медицинской помощью обращалось 347±33 человек на 100 тыс. населения в течение 2014–2020 гг. (согласно Государственному докладу «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 г.»). Среди инфекций, передающихся клещами (ИПК), наибольшее распространение и медицинское значение имеют иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), клещевые риккетсиозы (КР), Крымская-Конго геморрагическая лихорадка и клещевой энцефалит (КЭ). Эпидемиологическое неблагополучие по ИПК традиционно наблюдается в различных регионах Сибири, в том числе в Новосибирске и его пригородах, где приблизительно 20 тыс.

человек ежегодно обращаются за оказанием медицинской помощи после укуса клеща (согласно данным Управления Роспотребнадзора по Новосибирской области).

В южных регионах Западной Сибири описано не менее 11 видов иксодовых клещей, для которых доказано существование местных популяций [1]. При этом наибольшую эпидемиологическую значимость имеют клещи, входящие в экологическую группу пастбищных (или пастбищно-подстерегающих) клещей, способных активно нападать на человека. Прежде всего к ним можно отнести клещей родов *Ixodes* и *Dermacentor*. Изучение видового состава и распределения иксодовых клещей в лесопарковой зоне вблизи г. Новосибирска, проводимое в рамках долгосрочных наблюдений во второй половине XX в., показывало абсолютное доминирование *Ixodes persulcatus*. Клещи *Ixodes pavlovskyi* (Pom, 1946), *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794), *Haemaphysalis concinna* (Koch, 1884), *Haemaphysalis punctata* (Can. et Fanz., 1878) также обнаружива-

лись в природных очагах Западной Сибири [10]. Однако в последние годы клещи *I. pavlovskyi* начинают постоянно обнаруживаться в отдельных регионах на юге Западно-Сибирской равнины. Полевые исследования 2009–2010 гг. показали, что в окрестностях г. Новосибирска устойчиво обитают *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* при явном преобладании последнего [4, 5]. В г. Томске и его пригородах была обнаружена высокая численность клещей *I. pavlovskyi* и показана их возможная роль в распространении ИПК [3, 7]. При этом высокая численность *I. pavlovskyi* была зарегистрирована в биотопах, подвергающихся интенсивной рекреационной нагрузке.

В последнее время необычно широкое распространение в городских и пригородных биотопах получил луговой клещ. Ранее *D. reticulatus* был распространен в степных и лесостепных зонах Западной Сибири и преимущественно ассоциировался с местами выпаса домашнего скота совместно клещами *D. marginatus* [11]. Однако в 2015 г. численность лугового клеща возросла более чем в 200 раз в городских биотопах г. Томска в сравнении с предшествующим периодом [7]. Необычность ситуации, связанная с изменением видового состава клещей в крупных мегаполисах на юге Западной Сибири, позволила сформулировать гипотезу об изменении видового состава иксодовых клещей, нападающих на человека и способных передавать ИПК в этом регионе.

С этой целью было проведено определение видового состава иксодовых клещей, нападающих на людей в г. Новосибирске и его пригородах в течение теплого периода 2018 г., путем определения последовательности фрагмента митохондриального гена цитохромоксидазы COI. В работе определялся уровень инфицированности индивидуальных клещей возбудителями ИПК (вирус клещевого энцефалита, вирус Кемерово, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp.) с последующим секвенированием и генотипированием выявленных клещевых патогенов и их филогенетическим анализом.

Материалы и методы

В исследование вошла выборка из 1000 клещей, снятых с людей и обратившихся за медицинской помощью (с мая по сентябрь) на территории Новосибирской области в 2018 г. Укусы клещей были отмечены людьми в г. Новосибирске и его пригородах, а также в близлежащих районах (Искитимский, Черепановский, Коченевский, Мошковский, Тогучинский и Маслянинский). В течение мая, когда наблюдался пик числа укусов, было собрано 500 образцов клещей, а с июня по сентябрь было исследовано по 100 клещей, собранных в течение каждого месяца.

В ходе исследования проведен анализ индивидуальных образцов иксодовых клещей различных видов. До начала исследования клещи хранились при -70°C , индивидуально. Исследования проводили с соблюдением правил биобезопасности, регламентированных в МУ 1.3.2569-09, СП 1.3.3118-13, СП 3.1.3310-15, а также СанПиН 3.3686-21.

Клещи были дважды обработаны 70%-м этанолом для инактивации инфекционных агентов и промыты фосфатно-солевым буфером. Гомогенизацию полученных образцов осуществляли с использованием лабораторного гомогенизатора TissueLyserLT (Qiagen, Германия) в 500 мкл стерильного физиологического раствора. Выделение нуклеиновых кислот производили из 100 мкл гомогената с использованием коммерческого набора «АмплиПрайм РИБО-преп» (НексБио, Россия), получение кДНК в реакции обратной транскрипции выполнялось с помощью коммерческого набора «РЕВЕРТА-L» (АмплиСенс, Россия) согласно инструкциям производителей.

Видовую принадлежность исследуемых клещей выявляли путем определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитохромоксидазы COI, локализованного в митохондриальном геноме клеща.

Скрининг полученных образцов на наличие генетических маркеров изучаемых патогенов осуществляли с помощью ПЦР. ПЦР проводилась в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл двухкратного ПЦР-буфера (БиоЛабМикс, Россия), 0,2 мкМ каждого из праймеров и 3 мкл ДНК/кДНК. Праймеры, используемые в данной работе, и ожидаемая длина ампликонов представлены в табл. ПЦР проводили в амплификаторе T100 (BioRad, США) согласно следующей программе амплификации: активация полимеразы — 95°C , 5 мин; далее 38 последовательных циклов — денатурация 95°C , 15 с, отжиг праймеров (табл.), 20 с, элонгация — 72°C , 45 с; финальная элонгация — 72°C , 5 мин. Детекцию продуктов амплификации проводили методом гель-электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий в концентрации 2 мкг/мл. Определение нуклеотидных последовательностей полученных ПЦР-фрагментов проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 (ThermoFisher Scientific, США) с последующим анализом продуктов реакции на секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США). Анализ полученных хроматограмм проводили с помощью программы SeqMan (DNASTar, США). Филогенетический анализ проводили с помощью пакета филогенетических программ MEGA 7.0 методом максимального правдоподобия с использованием трехпараметрической

модели эволюции Тамуры T92 [19]. Показатель статистической надежности узлов филогенетического дерева рассчитывался с помощью бутстреп-анализа с использованием 1000 случайных реплик. 95% доверительный интервал (ДИ) уровня инфицированности клещей изучаемыми патогенами рассчитывался с использованием онлайн-сервиса (<http://www.pedro.org.au/english/downloads/confidence-interval-calculator>).

Нуклеотидные последовательности, полученные в данной работе, были депонированы в международную базу данных GenBank под номерами: MN187367-MN187402, MN177944-MN177946, MN234153-MN234157, MN007126, MT150584-MT150588 и MT253667-MT253669.

Результаты

Проведено определение видовой принадлежности клещей, нападающих на человека в Новосибирской области, путем секвенирования фрагмента гена COI, локализованного в митохондриальном геноме клеща. Видовое разнообразие клещей, нападающих на людей в Новосибирской области в весенне-летний и осенний периоды 2018 г., было представлено пятью видами клещей: *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *D. nuttali* (рис. 1).

Наиболее часто на человека нападали клещи видов *I. pavlovskyi* (43,6% среди общей выборки) и *D. reticulatus* (41,2%); на долю кле-

Таблица. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для выявления и амплификации генетического материала

Table. Oligonucleotide primers used to detect and to amplify a genetic material

Организм (ген-мишень) Organism (target gene)	Праймер Primer	Структура праймера (5'→3') Primer sequence (5'→3')	Температура отжига (°C) Annealing temperature (°C)	Длина ампликона (п.н.) Amplicon size (b.p.)	Ссылка Reference
<i>Ixodes spp. (cox1)</i>	IpCX_f	ATTAGGAGCACCTGATATAGCTTTCCC	60	660	[3]
	IpCX_r	GCTGTAATAAGCTCGAGTGTGCATA			
<i>Dermacentor spp. (cox1)</i>	DH_f	TCGAWTAGAAYTAAGACAACCTGG	52	610	Данное исследование Current study
	DH_r	GGTGRCCAAAAAATCAAATARATG			
TBE (<i>E-NS1</i> genes)	E7	GGCATAGAAAGGCTGACAGTG	52	341	[28]
	E10	GATACCTCTCTCCACACAACCAG			
	E9	ACAGTGATAGGAGAACACGCCTGGG	52	211	
	E8	CAGCCAGGAGGAAGCTCATGGAC			
KEMV genome (segment 1)	Kem1s_1	ATTCAAATACGACACGCACATGAC	56	517	
	Kem1s_2	GTATCGTCGCCGACGTACATCTC			
	Kem1s_3	GCTCATCGAAGCGGGATACGG	56	284	
	Kem1s_4	GCGTAGAGTTCTCTCCCGACAGATG			
<i>Borrelia</i> spp. (p66)	Borr1rF	GAAGYTAATCCCGAATTAGGCA	52	961	Данное исследование Current study
	Borr1rR	TTTCACCGTCRTCTTTATTCC			
	Borr2rF	CGAATTAGGCAAAGACGATCC	56	548	
	Borr2rR	TTTCATAAGCTCCTGATAAGCCA			
<i>Rickettsia</i> spp. (<i>gltA</i>)	CS1d	ATGACTAATGGCAATAATAA	57	535	[24]
	CS535r	GAATATTTATAAGACATTGC			
	CS409d	CCTATGGCTATTATGCTTGC			
	RP1258n	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	57	769	
	RgA-f	CAATCCGCTTTACAATAGCA			
	RgA-r	GTCAATAAACTTCTCACGATGG			
<i>Rickettsia</i> spp. (<i>sca4</i> gene D)	RiD_1f	TGTAACAACATCGGCTTGAC	57	776	Данное исследование Current study
	RiD_1r	CTGATCTGAACCTGAGTACC			
	RiD_2f	AAATGATGCAGGTGATGAACTC	57	619	
	RiD_2r	GGTTTGGATTTACTTGTGCGA			
	RiD_3f	GAACAACCGCTAATAACTCCA	57	673	
	RiD_3r	TCCGCATTGCTTAATTCAGAG			
	RiD_4f	GCAGTAGGTGATAAGGTTAATGTC	57	752	
	RiD_4r	AACAGCGTTAATTAATCTCCCGA			
	RiD_5f	GGTATTTATGAAGGCAAAGGAGG	57	846	
RiD_5r	ATCTTGATCAGCGTTGTGGAG				

шей *I. persulcatus* приходилось 10,7%, на долю *D. marginatus* — 4,0%. В единичных случаях среди клещей, нападающих на человека, был обнаружен клещ *D. nuttalli* (0,5%). Распределение видового разнообразия клещей, атакующих человека, очень сильно зависело от месяца исследуемого периода (рис. 1). Так в мае-июне месяце на человека преимущественно нападали клещи *I. pavlovskyi* (58–61%), а пик удельной активности клещей *I. persulcatus* приходился на июль месяц, когда его доля увеличивалась до 32% среди всех клещей, собранных с человека. В августе-сентябре практически все нападения на человека были связаны с клещами рода *Dermacentor* с преобладающим доминированием *D. reticulatus* (84–90%).

Генетический материал ВКЭ был обнаружен в 36 образцах клещей, суммарный уровень инфицированности составил 3,6% (95% ДИ: 2,6–4,9). ВКЭ был детектирован в клещах видов *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*. Уровень инфицированности клещей *I. persulcatus* составил 11,2% (95% ДИ: 9,7–14,3), *I. pavlovskyi* — 1,8% (95% ДИ: 0,9–3,5), *D. reticulatus* — 3,4% (95% ДИ: 2,1–5,6), *D. marginatus* — 5,1% (95% ДИ: 1,4–9,8). Генотипирование выявленных изолятов ВКЭ было проведено по фрагменту гена белка E (340 п.н.). Тридцать (83%) изолятов были отнесены к сибирскому генотипу, а 6 (17%) изолятов — к дальневосточному генотипу ВКЭ.

Все исследованные последовательности оказались оригинальными и не имели 100% сходства с известными прототипами ВКЭ (рис. 2). Наибольшее генетическое разнообразие демонстрировал кластер сибирских вариантов ВКЭ, отчетливо распадающийся на две субклады.

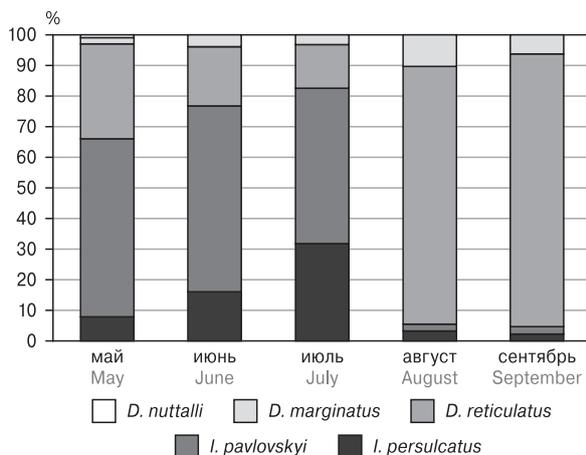


Рисунок 1. Изменение видового состава клещей, нападающих на людей в Новосибирске и его пригородах с мая по сентябрь 2018 г.

Figure 1. Changes in the human-attacking tick species composition in Novosibirsk and its suburbs within 2018 May-September interval

Варианты одной субклады имеют наибольший уровень гомологии с прототипными штаммами Заусаев (AF52415) и Алтай-115 (JQ687276), а другой субклады — с прототипом Курган-371-07 (FJ214150). Новосибирские изоляты дальневосточного генотипа имеют наибольшее сходство с прототипным штаммом Приморье-69 (EU816453).

В исследованных клещах генетического материала вируса Кемерово выявлено не было. Согласно литературным данным, основным переносчиком вируса Кемерово являются клещи *I. persulcatus*, инфицированность которых в Новосибирской области составляет всего 0,73% [29].

Генетический материал боррелий был обнаружен у 11,2% (95% ДИ: 9,7–14,3) клещей *I. persulcatus*, а у клещей *I. pavlovskyi* выявлен в 1,8% (95% ДИ: 0,9–3,5) случаев, у *D. reticulatus* —

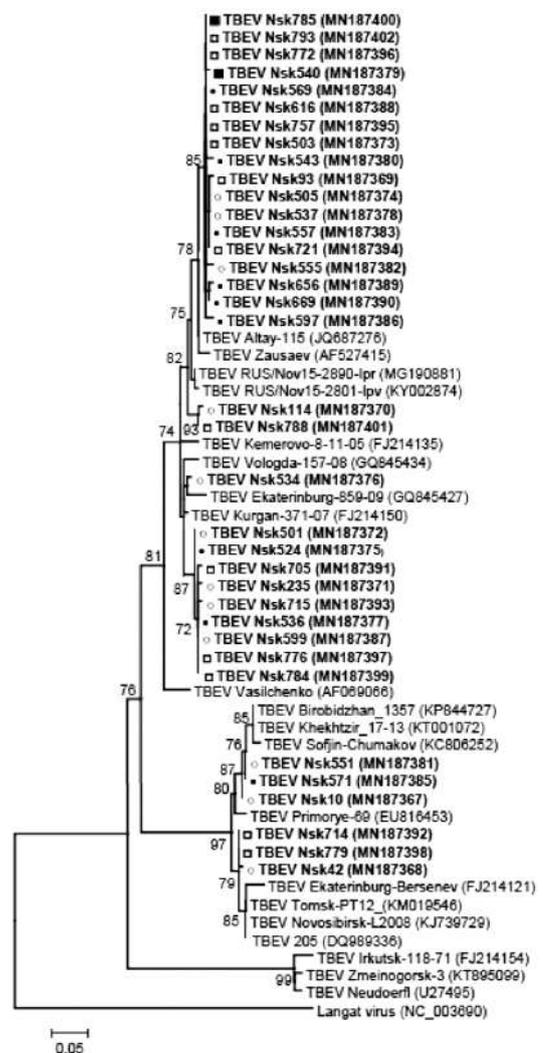


Рисунок 2. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей фрагмента гена E выявленных изолятов ВКЭ

Figure 2. Dendrogram of nucleotide sequences for gene E fragments in identified TBEV isolates

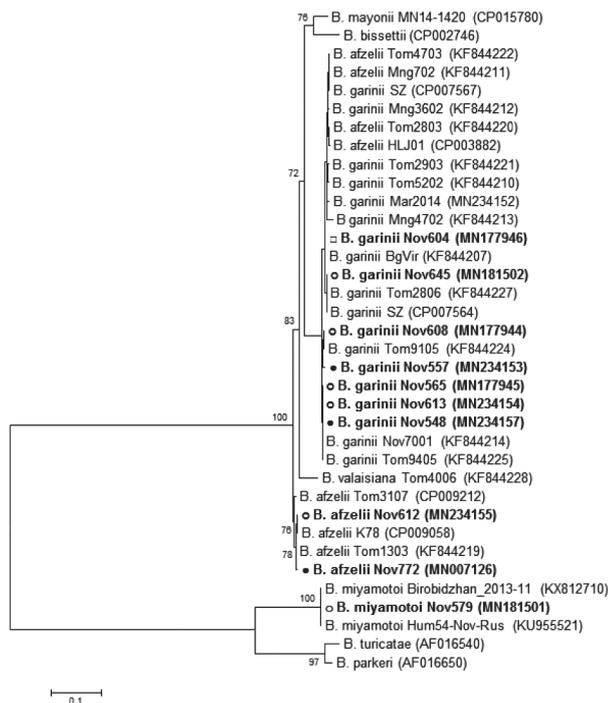


Рисунок 3. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *p66* выявленных изолятов боррелий

Figure 3. Dendrogram of nucleotide fragment *p66* gene sequences for detected *Borrelia* isolates

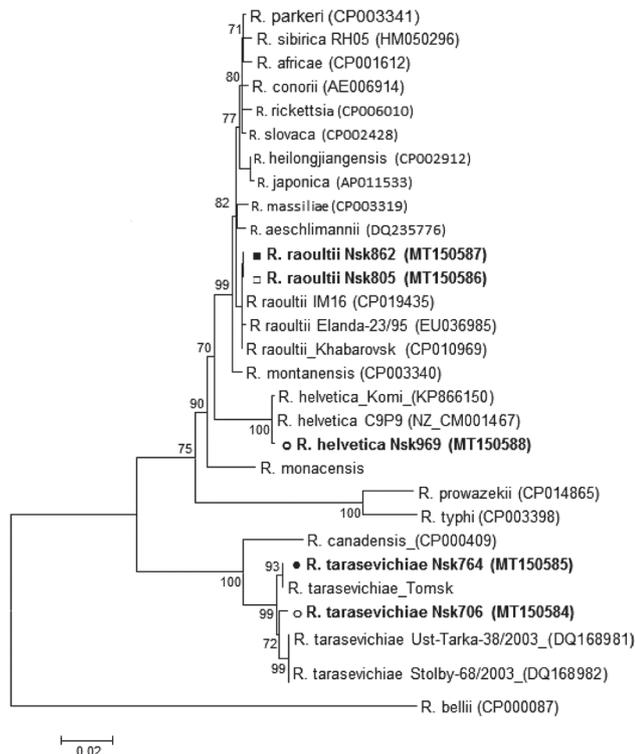


Рисунок 4. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *gitA* выявленных изолятов риккетсий

Figure 4. Dendrogram of nucleotide sequences *gitA* gene fragment for identified *Rickettsia* isolates

в 3,4% (95% ДИ: 2,1–5,6) и *D. marginatus* — в 5,1% (95% ДИ: 1,4–9,8). Генотипирование выявленных изолятов боррелий проведено по фрагменту гена *p66* (около 550 п.н.). Большинство выявленных изолятов боррелий были отнесены к виду *B. garinii* (86%), 13% изолятов к *B. afzelii*. В одном таежном клеще был обнаружен генетический материал *B. miyamotoi*, который оказался генетически близким к изоляту *B. miyamotoi* выделенному от пациента в г. Новосибирске в 2016 г.

Усредненный уровень инфицированности клещей риккетсиями составил 23,1% (95% ДИ: 20,6–25,1). Генетический материал *Rickettsia* spp. был выявлен в клещах 4 видов *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *D. reticulatus* и *D. marginatus*. Выявленные изоляты риккетсий были генотипированы путем определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитратсинтазы *gltA* (767 п.н.). Показано, что клещи рода *Dermacentor* имеют большую инфицированность *R. raoultii*, генетически близкую к изолятам, выделенным ранее во Франции, России и в 2016 г. в Китае от пациента. Клещи рода *Ixodes* в подавляющем случае заражены *R. tarasevichiae*. В одном клеще *I. persulcatus* был найден генетический материал *R. helvetica*. Уровень инфицированности клещей рода *Ixodes* составил 16,4% (95% ДИ: 13,3–19,9), *Dermacentor* — 29,3% (95% ДИ: 25,5–33,2). Для изучаемых изолятов *R. raoultii* и *R. helvetica* были определены полноразмерные нуклеотидные последовательности гена поверхностного белка *sca4*. Последовательность гена *sca4* изучаемых изолятов *R. raoultii* была полностью гомологична изоляту *R. raoultii* из клеща *D. reticulatus* в Томской области (МК304550) и на 99,9% прототипному штамму Marne, выделенному из *D. reticulatus* на востоке Франции (DQ365807). Уровень гомологии с изолятом, выделенным из клеща *D. silvarum* в Хабаровском крае (Khabarovsk, CP010969), составил 99,5%; а с изолятом, выделенным из клеща *D. nuttalli* на Алтае (Elanda-23/95, EU036983), — 99,2%. Нуклеотидная последовательность гена *sca4* выявленных изолятов *R. helvetica* оказалась полностью гомологична штамму *R. helvetica* C9P9 (AF163009), выделенному в Швейцарии из клеща *I. ricinus*.

Обсуждение

Новосибирск и его окрестные районы располагаются в лесной зоне юга Западно-Сибирской равнины, переходящей в лесостепь, и являются типичным местом совместного обитания клещей родов *Dermacentor* и *Ixodes*. По многолетним показателям периода 2010–2020 гг. Новосибирская область входит в группу со средним уровнем заболеваемости КЭ (5,5 на 100 тыс. населения) [6]; относится к территории эпидемической опасности по ИКБ выше

среднего уровня (9,35 на 100 тыс. населения) [9] и средней эпидемической опасности по КР (6,49 на 100 тыс. населения) [8].

Нами был обнаружен совершенно необычный факт доминирования клещей *I. pavlovskyi* и *D. reticulatus* среди всех клещей, собранных с человека. На их долю суммарно приходится 84,6% всех клещей снятых с человека. Доля таежного клеща, который считается принципиальным вектором для ИПК, составила всего чуть более 10% при контактах человека с иксодовыми клещами в Новосибирске и его пригородах. Только в июле месяце роль таежного клеща становилась значимой и достигала 32%. Можно предположить, что условия контакта человека и клеща в природных очагах г. Новосибирска и его пригородов существенно изменились. В настоящее время в этом окружении доминирует не таежный клещ, а клещи *I. pavlovskyi* и *D. reticulatus*. Распространение первого ранее ассоциировалось с птицами наземного яруса, а *D. reticulatus* — с местами выпаса домашнего скота [13]. Это косвенно подтверждается ранее опубликованными данными по г. Томску, где фактически в центре города (биотоп «Лагерный сад») концентрация *D. reticulatus* возросла более чем 200 раз в течение одного года наблюдения [6].

Обнаруженное генетическое разнообразие выявленных изолятов ВКЭ в клещах позволяет предположить, что указанный вирус в течение длительного периода времени эволюционировал на юге Западной Сибири. Это подтверждается ранее опубликованными данными по исследованию разнообразия ВКЭ природных биотопах исследуемого региона [28]. Нам удалось получить прямые данные о том, что на человека нападают клещи, инфицированные двумя генотипами ВКЭ. Эпидемиологическая значимость широкого распространения дальневосточного генотипа ВКЭ связана с его более высокой патогенностью для человека. Так, для вариантов ВКЭ дальневосточного генотипа, циркулирующих в Приморском крае, летальность может достигать более 30%, тогда как европейские и сибирские геноварианты вызывают более легкую форму заболевания с относительно низким уровнем летальности. Удалось выявить 18 изолятов в четырех видах клещей, наиболее близко кластеризующихся со штаммом Zausaev. Характерной особенностью штамма Zausaev является его способность вызывать хронические формы клещевого энцефалита [15].

Интересным представляется факт выявления достаточно большого количества изолятов сибирского и дальневосточного генотипа ВКЭ в клещах рода *Dermacentor*. Вирусофорность клещей рода *Dermacentor* на уровне, а то и выше,

вирусофорности клещей рода *Ixodes*, а заболеваемость КЭ в районах преобладания клещей рода *Dermacentor* ниже [18, 26]. Обращает на себя внимание относительно низкая вирусофорность клещей *I. pavlovskyi*, составляющая всего 1,8%, тогда как вирусофорность клещей *I. persulcatus* составила 11,2%. Существенное доминирование клещей *I. pavlovskyi* среди клещей, снятых с человека, может приводить к снижению биорисков инфицирования человека ВКЭ и уровня заболеваемости клещевым энцефалитом в Новосибирске и его пригородах.

Клещевой иксодовый боррелиоз обычно ассоциируется с *B. garinii* и *B. afzelii* на территории России [20, 21]. Принято считать, что ареал возбудителей ИКБ предопределяется распространением основных переносчиков заболевания: клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus*. В Сибири и на Дальнем Востоке генетический материал *Borrelia* spp. был обнаружен у клещей *I. pavlovskyi* и *Dermacentor* spp. Спонтанная инфицированность клещей боррелиями в природных очагах может составлять от 10 до 70% в различные годы. При этом инфицированность клещей *B. miyamotoi* значительно ниже, чем *B. garinii* и *B. afzelii*. Все эти три вида боррелий были обнаружены в исследованных клещах с очевидным доминированием *B. garinii* и при однократной детекции генетического материала *B. miyamotoi*. При этом в клещах, снятых с человека, максимально были инфицированы клещи *I. persulcatus*. Менее всего были инфицированы клещи *I. pavlovskyi*, для которых уровень инфицирования был более чем 6,5 раз ниже.

В четырех видах клещей нам удалось обнаружить генетический материал *R. raoultii*, *R. tarasevichiae* и *R. helvetica*. Уровень инфицирования клещей риккетсиозами достигал 23,1%. Принято считать, что *R. raoultii* является основным возбудителем клещевого риккетсиоза в Новосибирской области и ассоциируется с клещами рода *Dermacentor* [16]. Также *R. raoultii* обнаружена во многих странах Европы [22], в разных областях России (Новосибирская, Томская, Омская области, Республика Алтай, Республика Бурятия, Иркутская область, Приморский край, Хабаровский край и др.) и в Казахстане [3, 12, 13, 27].

На сегодняшний день *R. helvetica* широко распространена и обнаруживается как минимум в 24 странах Европы [22]. В азиатской части России *R. helvetica* была обнаружена в клещах *I. pavlovskyi*, *I. persulcatus* и *I. trianguliceps* в Новосибирской и Омской областях, Республике Алтай, а также на Дальнем Востоке [17, 23]. У пациентов, инфицированных *R. helvetica*, наблюдается лихорадка, редко регистрируется сыпь, описаны случаи перимиокардита и менингита [14].

R. tarasevichiae часто обнаруживается в клещах *I. persulcatus* (реже *I. pavlovskyi*) на территории Азиатской части России. Микст-инфицирование человека *R. tarasevichiae* и *R. helvetica* на территории РФ было выявлено в двух случаях, причем оба случая закончились летальным исходом. Совместное инфицирование *R. tarasevichiae* с *R. sibirica* было зарегистрировано в Красноярском крае [25], а с ВКЭ — в Новосибирской области [2]. Случаи моноинфицирования человека *R. tarasevichiae* были также ранее зафиксированы в Новосибирской области.

Таким образом, в данной работе были исследованы иксодовые клещи, нападающие на человека в Новосибирске и его пригородах, в течение всего теплого сезона 2018 г. Индивидуальный анализ 1000 клещей показал, что всего пять видов клещей нападают на жителей мегаполиса на юге Западной Сибири. При этом доминируют клещи *I. pavlovskyi* (43,6%) и *D. reticulatus* (41,2%). Роль таежного клеща, широко известного принципиального вектора для ИПК, существенно снизилась и составила всего 10,7%.

В клещах, снятых с человека, выявлен генетический материал ВКЭ (3,6%; 95% ДИ: 2,6–4,9),

боррелий (13,8%; 95% ДИ: 11,6–14,9) и риккетсий (23,1%; 95% ДИ: 20,6–25,1). Генотипирование и филогенетический анализ показал наличие генетического материала следующих возбудителей клещевых инфекций: сибирского и дальневосточного генотипа ВКЭ, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. miyamotoi*, *R. raoulti*, *R. tarasevichiae* и *R. helvetica*. Представляется, что совершенствование и своевременная диагностика этих возбудителей может иметь ключевое значение для проведения адекватной профилактики и лечения клещевых инфекций человека.

Благодарности

Исследования поддержаны Российской федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, государственное задание ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Богданов И.И. Иксодовые клещи Западной Сибири. Сообщение 1. Видовой состав // Естественные науки и экология: межвуз. сб. науч. тр. Т. 4. Омск: Изд-во ОмГПУ, 1999. С. 161–165. [Bogdanov I.I. Ixodid ticks of Western Siberia. Volume 1. Species composition. Natural sciences and ecology: interuniversity collection of scientific papers. *Omsk: Publishing House of Omsk State Pedagogical University, 1999, vol. 4, pp. 161–165. (In Russ.)*]
2. Власов В.В., Иголкина Я.П., Рар В.А., Краснова Е.И., Филимонова Е.С., Тикунов А.Ю., Епихина Т.И., Тикунова Н.В. Клещевые риккетсиозы в Западной Сибири. Первые российские случаи риккетсиозов, вызванных *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia raoultii* и *Rickettsia slovaca* // Национальные приоритеты России. 2021. Т. 3, № 42. С. 122–126. [Vlasov V.V., Igolkina Y.P., Rar V.A., Krasnova E.I., Filimonova E.S., Tikunov A.Y., Epihina T.I., Tikunova N.V. Tick-borne rickettsiosis in Western Siberia. The first Russian cases of rickettsiosis caused by *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia raoultii* and *Rickettsia slovaca*. *Nacional'nye priority Rossii = Russia's National Priorities, 2021, vol. 3, no. 42, pp. 122–126. (In Russ.)*]
3. Карташов М.Ю., Микрюкова Т.П., Кривошеина Е.И., Кузнецов А.И., Романенко В.Н., Москвитина Н.С., Терновой В.А., Локтев В.Б. Генотипирование возбудителей клещевых инфекций в клещах *Dermacentor reticulatus*, собранных в городских биотопах г. Томска // Паразитология. 2019. Т. 53, № 5. С. 355–369. [Kartashov M.Yu., Mikryukova T.P., Krivosheina E.I., Kuznetsov A.I., Romanenko V.N., Moskvitina N.S., Ternovoj V.A., Loktev V.B. Genotyping of tick-borne pathogens in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in urban biotopes of Tomsk. *Parazitologiya = Parasitology, 2019, vol. 53, no. 5, pp. 355–369. (In Russ.)*] doi: 10.1134/S0031184719050016
4. Ливанова Н.Н., Ливанов С.Г., Панов В.В. Особенности распределения клещей *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi* на границе лесной и лесостепной зон Приобья // Паразитология. 2011. Т. 45, № 2. С. 94–102. [Livanova N.N., Livanov S.G., Panov V.V. Features of the distribution of ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* on the border of the forest and forest-steppe zone of the Ob region. *Parazitologiya = Parasitology, 2011, vol. 45, no. 2, pp. 94–102. (In Russ.)*]
5. Малькова М.Г., Якименко В.В., Танцев А.К. Изменение границ ареалов пастбищных иксодовых клещей рода *Ixodes* на территории Западной Сибири // Паразитология. 2012. Т. 46, № 5. С. 369–383. [Mal'kova M.G., Yakimenko V.V., Tancev A.K. Changes in the range boundaries of pasture ticks of the genus *Ixodes* in Western Siberia. *Parazitologiya = Parasitology, 2012, vol. 46, no. 5, pp. 369–383. (In Russ.)*]
6. Никитин А.Я., Андаев Е.И., Толмачева М.И., Аюгин Н.И., Яценко Е.В., Матвеева В.А., Туранов А.О., Балахонов С.В. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации за 2011–2021 гг. и краткосрочный прогноз ее развития. // Проблемы особо опасных инфекций. 2022. № 1. С. 15–23. [Nikitin A.Ya., Andaev E.I., Tolmachyova M.I., Ayugin N.I., Yacmenko E.V., Matveeva V.A., Turanov A.O., Balahonov S.V. Epidemiological situation of tick-borne viral encephalitis in the Russian Federation for 2011–2021 and short-term forecast of its development. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections, 2022, no. 1, pp. 15–23. (In Russ.)*] doi: 10.21055/0370-1069-2022-1-15-23
7. Романенко В.Н., Соколенко В.В., Максимова Ю.В. Локальное формирование высокой численности клещей *Dermacentor reticulatus* (Parasitiformes, Ixodidae) в Томске // Паразитология. 2017. Т. 51, № 4. С. 345–353. [Romanenko V.N., Sokolenko V.V., Maksimova Yu.V. Local formation of high abundance of *Dermacentor reticulatus* (Parasitiformes, Ixodidae) ticks in Tomsk. *Parazitologiya = Parasitology, 2017, vol. 51, no. 4, pp. 345–353. (In Russ.)*]

8. Рудаков Н.В., Пеньевская Н.А., Кумпан Л.В., Блох А.И., Шпынов С.Н., Транквилевский Д.В., Штрек С.В. Эпидемиологическая ситуация по риккетсиозам группы клещевой пятнистой лихорадки в Российской Федерации в 2012–2021 гг. и прогноз на 2022–2026 гг. // Проблемы особо опасных инфекций. 2022. № 1. С. 54–63 [Rudakov N.V., Pen'evskaya N.A., Kumpan L.V., Bloh A.I., Shpynov S.N., Trankvilevskij D.V., Shtrek S.V. Epidemiological situation on rickettsiosis of the tick-borne spotted fever group in the Russian Federation in 2012–2021 and forecast for 2022–2026. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2022, no. 1, pp. 54–63. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2022-1-54-63
9. Рудакова С.А., Пеньевская Н.А., Блох А.И., Рудаков Н.В., Транквилевский Д.В., Савельев Д.А., Теслова О.Е., Канешова Н.Е. Обзор эпидемиологической ситуации по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2010–2020 гг. и прогноз на 2021 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2021. № 2. С. 52–61. [Rudakova S.A., Pen'evskaya N.A., Bloh A.I., Rudakov N.V., Trankvilevskij D.V., Savel'ev D.A., Teslova O.E., Kaneshova N.E. Review of the epidemiological situation of ixodid tick-borne borreliosis in the Russian Federation in 2010–2020 and forecast for 2021. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2021, no. 2, pp. 52–61. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2021-2-52-61
10. Сапегина В.Ф., Доронцова Н.А., Телегин В.И., Ивлева Н.Г., Добротворский А.К. Особенности распределения *Ixodes persulcatus* в лесопарковой зоне г. Новосибирска // Паразитология. 1985. Т. 19, № 5. С. 370–373. [Sapegina V.F., Doroncova N.A., Telegin V.I., Ivleva N.G., Dobrotvorskiy A.K. Features of the distribution of *Ixodes persulcatus* in the forest-park zone of the city of Novosibirsk. *Parazitologiya = Parasitology*, 1985, vol. 19, no. 5, pp. 370–373. (In Russ.)]
11. Якименко В.В., Малькова М.Г., Шпынов С.Н. Иксодовые клещи Западной Сибири: фауна, экология, основные методы исследования. Омск: Омский научный вестник, 2013. 240 с. [Yakimenko V.V., Mal'kova M.G., Shpynov S.N. Ixodid ticks of Western Siberia: fauna, ecology, basic research methods. *Omsk: Omskiy nauchnyy vestnik*, 2013. 240 p. (In Russ.)]
12. Якович Н.В., Бондаренко Е.И., Адельшин Р.В., Мельникова О.В., Вершинин Е.А., Морозов И.М., Борисов С.А., Андаев Е.И. Выявление ДНК возбудителей клещевого риккетсиоза в клещах на территории Иркутской области // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015. Т. 14, № 6. С. 43–46. [Yakovchic N.V., Bondarenko E.I., Adel'shin R.V., Mel'nikova O.V., Vershinin E.A., Morozov I.M., Borisov S.A., Andaev E.I. Detection of DNA of tick-borne rickettsiosis pathogens in ticks in the Irkutsk region. *Epidemiologiya i Vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2015, vol. 14, no. 6, pp. 43–46. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2015-14-6-43-46
13. Dedkov V.G., Simonova E.G., Beshlebova O.V., Safonova M.V., Stukolova O.A., Verigina E.V., Savinov G.V., Karaseva I.P., Blinova E.A., Granitov V.M., Arsenjeva I.V., Shipulin G.A. The burden of tick-borne diseases in the Altai region of Russia. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2017, vol. 8, no. 5, pp. 787–794. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.06.004
14. Fournier P.E., Allombert C., Supputamongkol Y., Caruso G., Brouqui P., Raoult D. Aneruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 2, pp. 816–818. doi: 10.1128/JCM.42.2.816-818.2004
15. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.*, 2003, vol. 57, no. 1, pp. 129–146 doi: 10.1016/s0166-3542(02)00206-1
16. Igolkina Y., Krasnova E., Rar V., Savelieva M., Epikhina T., Tikunov A., Khokhlova N., Provorova V., Tikunova N. Detection of causative agents of tick-borne rickettsioses in Western Siberia, Russia: identification of *Rickettsia Raoultii* and *Rickettsia Sibirica* DNA in clinical samples. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2018b, vol. 24, no. 2, pp. 199–211. doi: 10.1016/j.cmi.2017.06.003
17. Igolkina Y.P., Rar V.A., Yakimenko V.V., Malkova M.G., Tancev A.K., Tikunov A.Y., Epikhina T.I., Tikunova N.V. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Ixodes persulcatus*/*Ixodes trianguliceps* sympatric areas from Western Siberia, Russia: Identification of a new *Candidatus Rickettsia* species. *Infect. Genet. Evol.*, 2015, vol. 34, pp. 88–93. doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.015
18. Kholodilov I., Belova O., Burenkova L., Korotkov Y., Romanova L., Morozova L., Kudriavtsev V., Gmyl L., Belyaletdinova I., Chumakov A., Chumakova N., Dargyn O., Galatsevich N., Gmyl A., Mikhailov M., Oorzhak N., Polienko A., Saryglar A., Volok V., Yakovlev A., Karganova G. Ixodid ticks and tick-borne encephalitis virus prevalence in the South Asian part of Russia (Republic of Tuva). *Ticks Tick Borne Dis.*, 2019, vol. 10, no. 5, pp. 959–969. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.04.019
19. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 2016, vol. 33, no. 7, pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
20. Mukhacheva T.A., Kovalev S.Y. *Borrelia* spirochetes in Russia: Genospecies differentiation by real-time PCR. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2014, vol. 5, no. 6, pp. 722–726. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.05.016
21. Mukhacheva T.A., Kovalev S.Y. Multilocus sequence analysis of *Borrelia burgdorferi* s.l. in Russia. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2013, vol. 4, no. 4, pp. 275–279. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.02.004
22. Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Mediannikov O., Kernif T., Abdad M.Y., Stenos J., Bitam I., Fournier P.E., Raoult D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, vol. 26, no. 4, pp. 657–702. doi: 10.1128/CMR.00032-13
23. Rar V., Livanova N., Tkachev S., Kaverina G., Tikunov A., Sabitova Y., Igolkina Y., Panov V., Livanov S., Fomenko N., Babkin I., Tikunova N. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia. *Parasit. Vectors*, 2017, vol. 10, no. 1: 258. doi: 10.1186/s13071-017-2186-5
24. Roux V., Rydkina E., Eremeeva M., Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the *Rickettsia* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, vol. 47, no. 2, pp. 252–261. doi: 10.1099/00207713-47-2-252
25. Rudakov N., Samoilenko I., Shtrek S., Igolkina Y., Rar V., Zhirakovskaya E., Tkachev S., Kostrykina T., Blokhina I., Lentz P., Tikunova N. A fatal case of tick-borne rickettsiosis caused by mixed *Rickettsia sibirica* subsp. *sibirica* and «*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*» infection in Russia. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2019, vol. 10, no. 6: 101278. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101278
26. Shchuchinova L.D., Kozlova I.V., Zlobin V.I. Influence of altitude on tick-borne encephalitis infection risk in the natural foci of the Altai Republic, Southern Siberia. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2015, vol. 6, no. 3, pp. 322–329. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.02.005
27. Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N., Tarasevich I., Raoult D. Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006b, vol. 1078, pp. 378–383. doi: 10.1196/annals.1374.075

28. Tkachev S.E., Babkin I.V., Chicherina G.S., Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Demina T.V., Lisak O.V., Doroshchenko E.K., Dzhioev Y.P., Suntsova O.V., Belokopytova P.S., Tikunov A.Y., Savinova Y.S., Paramonov A.I., Glupov V.V., Zlobin V.I., Tikunova N.V. Genetic diversity and geographical distribution of the Siberian subtype of the tick-borne encephalitis virus. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2020, vol. 11, no. 2, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101327
29. Tkachev S.E., Tikunov A.Y., Babkin I.V., Livanova N.N., Livanov S.G., Panov V.V., Yakimenko V.V., Tantsev A.K., Taranenko D.E., Tikunova N.V. Occurrence and genetic variability of Kemerovo virus in Ixodes ticks from different regions of Western Siberia, Russia and Kazakhstan. *Infect. Genet. Evol.*, 2017, vol. 47, pp. 56–63. doi: 10.1016/j.meegid.2016.11.007

Авторы:

Карташов М.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия; научный сотрудник лаборатории биотехнологии и вирусологии ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия;

Кривошеина Е.И., младший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Свирин К.А., стажер-исследователь отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Тупота Н.Л., к.б.н., старший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Терновой В.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии особо опасных инфекций отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Локтев В.Б., д.б.н., профессор, зав. отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия; профессор кафедры биомедицинской физики ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов ФГБУН ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия.

Authors:

Kartashov M.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; Researcher, Biotechnology and Virology Laboratory, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation;

Krivosheina E.I., Research Assistant, Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Svirin K.A., Research Assistant, Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Tupota N.L., PhD (Biology), Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Ternovoi V.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology of Highly Dangerous Infections, Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Loktev V.B., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; Professor, Chair of Biomedical Physics, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation; Leading Researcher, Laboratory of the Molecular Mechanisms of Pathological Processes, Institute of Cytology and Genetics the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 22.06.2022
Отправлена на доработку 20.08.2022
Принята к печати 02.11.2022

Received 22.06.2022
Revision received 20.08.2022
Accepted 02.11.2022

ДИНАМИКА КЛИНИЧЕСКОЙ СИМПТОМАТИКИ И СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ

А.А. Хасанова¹, М.П. Костинов^{2,3}, И.Л. Соловьева¹, Т.Н. Никитина⁴,
Е.А. Хромова²

¹ ФГБОУ ВПО Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск, Россия

² ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, Россия

⁴ ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. Период выздоровления от COVID характеризуется сохранением ряда симптомов, также большое значение имеют и иммунологические изменения. Разработка профилактических мер с целью нормализации мукозального иммунитета после перенесенной коронавирусной инфекции определяет актуальность проведенного исследования. Цель — изучить в динамике клиническую симптоматику и уровень sIgA у лиц после перенесенной коронавирусной инфекции и оценить эффективность применения препарата IFN α -2b. **Материалы и методы.** Проведено исследование пациентов от 18 до 60 лет ($n = 130$) с давностью после перенесенной инфекции от 1 до 9 месяцев и условно здоровых лиц, не болевших COVID-19 ($n = 15$). Факты о перенесенной коронавирусной инфекции и постковидных проявлениях установлены на основании медицинской документации, жалоб, данных анамнеза, физикального осмотра и анкетирования. Концентрацию sIgA в слюне и соскобах эпителия носоглотки определяли в динамике до применения местной терапии препаратом IFN α -2b (гель, интраназально 2 раза в день в течение 30 дней) и после нее. **Результаты.** Острый период COVID-19 характеризовался повышением температуры тела, anosmией, выраженной астенией (усталостью и слабостью), болью в мышцах и суставах. В группе ранних постковидных проявлений (1–3 мес.) достоверно чаще выявлена боль в суставах и мышцах (75,0%) и повышение температуры тела (21,2%), а в группе длительных постковидных проявлений (6–9 мес.) преобладание с одинаковой частотой одышки, мышечно-суставной боли (по 75,8%). По результатам обследования группы здоровых определена условная норма показателя секреторного IgA в слюне — $6,45 \pm 1,81$ мг/мл и назальных смывах — $13,43 \pm 3,24$ мг/мл. В группе ранних постковидных проявлений отмечен достоверный, более чем в 3 раза, прирост уровня секреторного IgA в слюне (с $1,84 \pm 0,28$ до $5,78 \pm 1,96$ мг/мл) и 1,5 раза в назальных смывах (с $28,61 \pm 3,0$ до $39,83 \pm 3,85$ мг/мл) спустя месяц на фоне терапии препаратом IFN α -2b. В группе больных без интерферонотерапии стойко сохраняющиеся сниженные показатели sIgA фиксируются в течение 9 мес. после перенесенной COVID-19. Так, уровень sIgA слюны определялся в значениях от $2,36 \pm 0,56$ до $2,16 \pm 0,66$ мг/мл, а в назальных смывах от $15,66 \pm 1,32$ до $10,23 \pm 1,07$ мг/мл без достоверной разницы с исходными данными. Частота респираторных заболеваний преобладала в этой группе (27,6% случаев), при полном их отсутствии у лиц, получавших препарат IFN α -2b.

Адрес для переписки:

Хасанова Альбина Альбертовна
432049, Россия, г. Ульяновск, ул. Аблукова, 89,
Ульяновский государственный университет.
Тел.: 8 (983) 169-18-54.
E-mail: albinafeizer@yandex.ru

Contacts:

Albina A. Khasanova
432049, Russian Federation, Ulyanovsk, Ablukova str., 89,
Ulyanovsk State University.
Phone: +7 (983) 169-18-54.
E-mail: albinafeizer@yandex.ru

Для цитирования:

Хасанова А.А., Костинов М.П., Соловьева И.Л., Никитина Т.Н.,
Хромова Е.А. Динамика клинической симптоматики и секреторного
иммуноглобулина А у пациентов, перенесших коронавирусную
инфекцию // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1113–1122.
doi: 10.15789/2220-7619-DOC-2042

Citation:

Khasanova A.A., Kostinov M.P., Soloveva I.L., Nikitina T.N., Khromova E.A.
Dynamics of clinical symptoms and secretory immunoglobulin A
in COVID-19 convalescent patients // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1113–1122.
doi: 10.15789/2220-7619-DOC-2042

Заключение. В постковидный период сохраняются полиорганные нарушения и зарегистрированы сниженные показатели sIgA. Интраназальное применение препарата IFN α -2b позволило нормализовать уровень sIgA и предупредить наложение респираторных инфекций.

Ключевые слова: интерферон альфа-2b, COVID-19, мукозальный иммунитет, постковидный период, sIgA, слюна, назальные смывы.

DYNAMICS OF CLINICAL SYMPTOMS AND SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A IN COVID-19 CONVALESCENT PATIENTS

Khasanova A.A.^a, Kostinov M.P.^{b,c}, Soloveva I.L.^a, Nikitina T.N.^d, Khromova E.A.^b

^a Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

^b I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^c First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^d Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Abstract. The post-COVID-19 recovery period is characterized by persistence of some symptoms, with immunological alterations being of great importance. Development of preventive measures to normalize mucosal immunity after a coronavirus infection determines the relevance of the current study. The aim was to study dynamics of clinical symptoms and level of secretory immunoglobulin A in individuals after a novel coronavirus infection as well as evaluate effectiveness of using IFN α -2b. **Materials and methods.** A study was conducted with patients aged 18 to 60 years old (n = 130), surveyed 1 to 9 months after post-infection, as well as in apparently healthy individuals lacking COVID-19 (n = 15). Previous novel coronavirus infection and post-COVID manifestations were verified based on medical documentation, complaints, anamnesis data, physical examination and questionnaires. The concentration of salivatory and nasopharyngeal mucosal sIgA was measured dynamically prior to and after administration of local therapy with IFN α -2b (gel applied intranasally twice a day for 30 days). **Results.** The acute period of COVID-19 was characterized by fever, anosmia, severe asthenia (fatigue and weakness), muscle and joint pain. Among the post-COVID manifestations at early period (1–3 months), pain in the joints and muscles (75.0%) as well as elevated body temperature (21.2%) were reliably detected, whereas in the long period (6–9 months) there were revealed dominance with the same frequency of shortness of breath, muscle and joint pain (75.8%, respectively). Based on examination data in healthy subjects, there was determined an arbitrary normal range of secretory IgA in saliva — 6.45 \pm 1.81 mg/ml and nasal swabs — 13.43 \pm 3.24 mg/ml. In the group of patients 1–3 months post-infection, therapy with IFN α -2b one month later resulted in significantly increased level of secretory IgA in saliva (from 1.84 \pm 0.28 to 5.78 \pm 1.96 mg/ml) and in nasal swabs (from 28.61 \pm 3.0 to 39.83 \pm 3.85 mg/ml) by more than 3- and 1.5-fold, respectively. In the group of patients without therapy was featured with stably sustained decline in sIgA level up to 9 months after COVID-19. In particular, the level of saliva sIgA ranged from 2.36 \pm 0.56 down to 2.16 \pm 0.66 mg/ml, and in nasal smears — from 15.66 \pm 1.32 to 10.23 \pm 1.07 mg/ml that differed insignificantly compared to baseline level. The rate of respiratory diseases prevailed in this group (27.6% of cases), which fully lacked in the group of topically administered IFN α -2b. **Conclusion.** In the post-COVID period, multiple organ disorders persist and reduced sIgA level is registered. Intranasally applied IFN α -2b made possible to normalize sIgA level and prevent accumulation of respiratory infectious pathologies.

Key words: interferon alpha-2b, COVID-19, mucosal immunity, post-COVID period, sIgA, saliva, nasal swabs.

Введение

Пандемия новой коронавирусной инфекции (COVID-19) на текущий момент по-прежнему остается актуальной проблемой во всем мире. До сих пор открыт вопрос о последствиях данной инфекции и о перспективах реабилитационных мероприятий на этапе реконвалесценции [3, 10, 22]. Сообщалось, что период выздоровления от COVID характеризуется сохранением ряда симптомов или появлением новых, даже среди тех, у кого изначально было легкое течение заболевания.

По данным ряда исследований определены наиболее частые симптомы периода после перенесенной коронавирусной инфекции. Так, было показано, что повышение температуры регистрировалось практически в 98% случаев, а асте-

ния, сухой кашель, боли в мышцах являлись лидирующими среди всех проявлений [15, 20, 24, 29, 31, 32]. Данные изменения были охарактеризованы как постковидный синдром [11, 17, 27]. Постковидный синдром — это мультисистемное расстройство, которое развивается после острого эпизода болезни. Информация, указывающая на точный патогенез развития данного состояния ограничена. По данным литературы симптомы могут быть легкими, такими как усталость, кашель, одышка, выпадение волос, или тяжелыми, приводящими к инсульту, почечной недостаточности, сердечным нарушениям и росту других хронических заболеваний [12, 27]. Полная клиническая картина постковидного синдрома сложна и до конца не изучена. Однако вирусный тропизм к рецептору ACE2, который экспрессируется во многих тканях организма, может

определять восприимчивость как к острым, так и к хроническим повреждениям, что еще больше усложняет клиническую картину постковидного синдрома [28]. Следовательно, дальнейшее изучение механизмов и развитие направления диагностики в постковидном периоде является важным в контроле инфекционного процесса.

Помимо клинических последствий большое значение имеют иммунологические изменения, которые интенсивно изучаются в последние годы. Особую роль отводят исследованию мукозального иммунитета. Известно, что вирус SARS-CoV-2 обладает способностью поражать эпителиальные клетки защитного слизистого барьера, содержащего большую часть клеток иммунной системы. Эти изменения могут иметь последствия в виде отсроченных симптомов, поскольку иммунитет тканей слизистых оболочек является богатым резервуаром защитных факторов, например, таких как секреторный иммуноглобулин А (sIgA) [7, 25]. Данный иммуноглобулин представляет собой димер и синтезируется плазматическими клетками слизистых тканей и желез. Протективная функция заключается в способности блокировать патогены, препятствии адгезии чужеродных агентов и предотвращении опосредованных воспалительных эффектов комплемента. Из вышеизложенного следует, что sIgA является одной из первых линий защиты слизистых от негативного влияния окружающей среды [6, 19, 30].

Основываясь на данных о патогенезе коронавирусной инфекции установлено, что SARS-CoV-2 ингибирует индукцию интерферонов, в то же время отмечается выраженная чувствительность при экзогенной интерфероновой стимуляции *in vitro* [8]. Это дает основание предполагать высокую эффективность препаратов интерферона в терапии коронавирусной инфекции [23].

Проведенные исследования показали клиническую эффективность местного применения препаратов на основе IFN α -2b в активации факторов защиты слизистых оболочек, в том числе и при коронавирусной инфекции [1, 2, 4, 5, 9, 13]. Следовательно, изучение возможностей использования в профилактической терапии препаратом IFN α -2b и влияния на мукозальный иммунитет после перенесенной коронавирусной инфекции представляет особый интерес и определяет актуальность проведенного исследования.

Цель исследования: изучить в динамике клиническую симптоматику и уровень sIgA у лиц, после перенесенной коронавирусной инфекции и оценить эффективность применения препарата IFN α -2b.

Материалы и методы

В проспективном открытом контролируемом исследовании приняли участие пациенты в возрасте от 18 до 60 лет (группа после COVID-19, n = 130) с давностью после перенесенной коронави

русной инфекции от 1 до 9 месяцев. Группу контроля (n = 15) составили условно здоровые лица, не болевшие COVID-19, у которых исследовали только параметры мукозального иммунитета. Характеристика групп исследования представлена в табл. 1.

Информация о течении коронавирусной инфекции в группах исследования подтверждалась данными медицинской документации. Оценку постковидных проявлений проводили на основании клинического осмотра, включавшего сбор жалоб, данных анамнеза, и анкетирования. От всех участников было получено письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Протокол клинического исследования соответствует Хельсинской Декларации Всемирной медицинской ассоциации о биоэтике и правах человека и одобрен локальным этическим комитетом по этике ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (протокол № 11 от 03.11.2021 г.).

Для оценки симптомов течения острого периода в анамнезе и постковидного периодов коронавирусной инфекции 130 участников исследования были распределены на 3 группы в соответствии с временным интервалом, прошедшим после перенесенного заболевания: группа ранних постковидных проявлений (1–3 мес.) — I группа; группа поздних постковидных проявлений (3–6 мес.) — II группа; группа длительных постковидных проявлений (6–9 мес.) — III группа (табл. 2).

В последующем для проспективной оценки состояния мукозального иммунитета пациенты группы исследования были поровну разделены на получавших и не получавших интраназально препарат IFN α -2b (n = 65) (табл. 3).

В качестве материала для исследования мукозального иммунитета использовали образцы слюны и соскобы эпителиальных клеток со слизистой носоглотки, собранные в одноразовые

Таблица 1. Гендерный состав и возраст участников исследования

Table 1. Gender composition and age of study participants

	Группа после COVID-19 Group after COVID-19 n = 130	Группа контроля Control group n = 15
Женщины Women	78,4% (102)	86,7% (13)
Мужчины Men	21,6% (28)	13,3% (2)
Средний возраст, лет Average age, years	48,5 \pm 1,2	32 \pm 5,66

Примечание. % (n) — относительные и абсолютные показатели данных у обследованных больных.

Note. % (n) — absolute and relative data in patients examined.

Таблица 2. Распределение участников исследования в зависимости от сроков после перенесенной COVID-19 инфекции

Table 2. Distribution of study participants aligned with timeframe after COVID-19 infection

Временной интервал после COVID-19 инфекции (группа исследования) Time interval after COVID-19 infection (study group)	Число участников группы Number of group participants n = 130
1–3 месяца (I группа) 1–3 months (I group)	52 (40,0%)
3–6 месяцев (II группа) 3–6 months (II group)	45 (34,6%)
6–9 месяцев (III группа) 6–9 months (III group)	33 (25,4%)

Примечание. n (%) — абсолютные и относительные показатели данных у обследованных больных.
Note. n (%) — absolute and relative data indicators in the examined patients.

пробирики. Измерение концентрации sIgA в исследуемых образцах проводили с использованием наборов реагентов для иммуноферментного анализа (АО «Вектор-Бест», Россия) до применения препарата рекомбинантного IFN α -2b и через месяц после завершения курса. Профилактическую терапию проводили с использованием препарата «ВИФЕРОН®» (концентрация действующего вещества составляет 36 000 МЕ/г), который назначался по схеме с нанесением полоски геля до 0,5 см на предварительно очищенную слизистую носовых ходов — 2 раза в день в течение 30 дней.

Статистический анализ полученных результатов проводили с применением пакета прикладных программ Statistica для Windows 10.0 (StatSoft Inc., США, 2010) и Microsoft Excel, 2007 (Microsoft, США). Частоту встречаемости ана-

Таблица 3. Распределение пациентов групп исследования в зависимости от проводимой терапии препаратом IFN α -2b на этапе реабилитации

Table 3. Distribution of patients depending on timeframe after COVID-19 infection and therapy applied at rehabilitation stage

Группа исследования Study group	Терапия с препаратом IFN α -2b Therapy with IFN α -2b n = 65	Терапия без препарата IFN α -2b Therapy without IFN α -2b n = 65
I группа I group	27 (41,6%)	25 (38,4%)
II группа II group	21 (32,3%)	24 (37%)
III группа III group	17 (26,1%)	16 (24,6%)

Примечание. n (%) — абсолютные и относительные показатели данных у обследованных больных.
Note. n (%) — absolute and relative data in patients examined.

лизируемых признаков выражали в абсолютных и относительных значениях. Достоверность показателей определялась с использованием критерия хи-квадрат (χ^2) Пирсона и уровнем доверительной вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Ретроспективный анализ клинических проявлений острого периода коронавирусной инфекции у наблюдаемых пациентов в группах исследования. Данные ретроспективного анализа симптомов, которые регистрировались у пациентов в остром периоде после коронавирусной инфекции, представлены в табл. 4. В целом среди всех наблюдаемых 130 пациентов наиболее частыми симптомами были повышение температуры тела, аносмия, астения, боль в мышцах и суставах.

Анализ данных медицинской документации и анкетирования по группам наблюдения показал, что у пациентов I группы одышка в остром периоде коронавирусной инфекции регистрировалась в 2,3 раза чаще в сравнении с пациентами II группы (30/57,7% против 17/37,8%; $\chi^2 = 3,831$, $p = 0,05$). Также у пациентов I группы имело место головокружение, тогда как во II группе подобный симптом отсутствовал (12/23,1% против 0/0,0%; $\chi^2 = 11,851$, $p < 0,001$).

У больных III группы в разгар заболевания достоверно чаще по сравнению с пациентами I и II группы отмечался сухой кашель — 23 человека (69,7%) против 21 (40,4%; $\chi^2 = 6,947$, $p = 0,009$) и 21 (46,7%; $\chi^2 = 4,107$, $p = 0,043$) соответственно. Выделение мокроты наблюдалось у больных III группы 1,4 раза чаще, чем в I группе (11/33,3% против 8/15,4%; $\chi^2 = 3,747$, $p = 0,05$), а головокружение отмечали 11/33,3% больных III группы, в то время как у пациентов II группы подобный симптом отсутствовал (0/0,0%; $\chi^2 = 17,463$, $p < 0,001$).

Повышение температуры тела, боль в мышцах и суставах, астения определены как наиболее частые клинических проявлений в острый период инфекционного процесса, однако данные статистической значимости не достигли. Также во всех группах больных, без достоверных межгрупповых различий, присутствовала симптоматика, в целом характерная для вирусных инфекций: боль в горле, заложенность и отделяемое из носа.

Согласно данным анкетирования, было отмечено и наличие неврологических нарушений (головная боль, аносмия, дисгевзия) в группах исследования, что может указывать на вероятное поражение клеток нервной ткани вследствие тропизма вируса SARS-CoV-2 к нервным клеткам. Следует отметить, что симптомы со стороны желудочно-кишечного тракта, как диспепсия, расстройство стула выявлены у значительно меньшего числа лиц в группе исследования. В имеющейся литературе указанные симптомы в некоторых случаях были описаны как начальные при инфицировании COVID-19 [21].

Таблица 4. Ретроспективный анализ клинического течения острого периода коронавирусной инфекции у наблюдаемых групп исследования

Table 4. Retrospective analysis of clinical course for acute period of novel coronavirus infection in surveyed study groups

Клинические проявления Clinical manifestations	Группы исследования Study groups			Всего Total n = 130	p
	I группа I group n = 52	II группа II group n = 45	III группа III group n = 33		
Повышение температуры тела Body temperature rise	75,0% (39)	60,0% (27)	72,7% (24)	69,3% (90)	$p_{1-2} = 0,11$ $p_{1-3} = 0,81$ $p_{2-3} = 0,24$
Чувство нехватки воздуха Feeling shortness of breath	30,8% (16)	24,4% (11)	21,2% (7)	26,1% (34)	$p_{1-2} = 0,48$ $p_{1-3} = 0,33$ $p_{2-3} = 0,73$
Одышка Dyspnoea	57,7% (30)	37,8% (17)	39,4% (13)	46,1% (60)	$p_{1-2} = 0,05$ $p_{1-3} = 0,1$ $p_{2-3} = 0,88$
Боль в грудной клетке Chest pain	25,0% (13)	24,4% (11)	9,1% (3)	20,7% (27)	$p_{1-2} = 0,95$ $p_{1-3} = 0,06$ $p_{2-3} = 0,081$
Сухой кашель Dry cough	40,4% (21)	46,7% (21)	69,7% (23)	50,0% (65)	$p_{1-2} = 0,53$ $p_{1-3} = 0,009$ $p_{2-3} = 0,043$
Мокрота Sputum	15,4% (8)	20,0% (9)	33,3% (11)	21,5% (28)	$p_{1-2} = 0,55$ $p_{1-3} = 0,05$ $p_{2-3} = 0,183$
Боль в горле Sore throat	50,0% (26)	42,2% (19)	54,5% (18)	48,4% (63)	$p_{1-2} = 0,44$ $p_{1-3} = 0,68$ $p_{2-3} = 0,28$
Заложенность и отделяемое из носа Nasal congestion and secretion	59,6% (31)	53,3% (24)	48,5% (16)	54,6% (71)	$p_{1-2} = 0,53$ $p_{1-3} = 0,31$ $p_{2-3} = 0,67$
Аносмия Anosmia	67,3% (35)	71,1% (32)	57,6% (19)	66,1% (86)	$p_{1-2} = 0,68$ $p_{1-3} = 0,36$ $p_{2-3} = 0,21$
Дисгевзия Dysgeusia	40,4% (21)	26,7% (12)	27,3% (9)	32,3% (42)	$p_{1-2} = 0,15$ $p_{1-3} = 0,21$ $p_{2-3} = 0,95$
Головная боль Headache	38,5% (20)	26,7% (12)	24,2% (8)	30,7% (40)	$p_{1-2} = 0,21$ $p_{1-3} = 0,17$ $p_{2-3} = 0,88$
Головокружение Dizziness	23,1% (12)	0,0% (0)	33,3% (11)	17,6% (23)	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} = 0,3$ $p_{2-3} < 0,001$
Усталость, слабость Fatigue, weakness	65,4% (34)	68,9% (31)	75,8% (25)	69,3% (90)	$p_{1-2} = 0,71$ $p_{1-3} = 0,31$ $p_{2-3} = 0,5$
Снижение аппетита Loss of appetite	26,9% (14)	17,8% (8)	15,2% (5)	20,7% (27)	$p_{1-2} = 0,28$ $p_{1-3} = 0,2$ $p_{2-3} = 0,75$
Диспепсия Dyspepsia	9,6% (5)	8,9% (4)	15,2% (5)	10,7% (14)	$p_{1-2} = 0,9$ $p_{1-3} = 0,44$ $p_{2-3} = 0,39$
Нарушения стула Altered defecation pattern	7,7% (4)	8,9% (4)	6,1% (2)	7,7% (10)	$p_{1-2} = 0,83$ $p_{1-3} = 0,77$ $p_{2-3} = 0,64$
Боль в суставах и мышцах Joint and muscle pain	73,1% (38)	64,4% (29)	60,6% (20)	67,0% (87)	$p_{1-2} = 0,35$ $p_{1-3} = 0,23$ $p_{2-3} = 0,73$

Примечание. % (n) — абсолютные и относительные показатели данных у обследованных больных; статистически достоверные межгрупповые различия по критерию χ^2 : p_{1-2} — различия между группами I и II; p_{1-3} — различия между группами I и III; p_{2-3} — различия между группами II и III.
 Note. % (n) — absolute and relative data in patients examined; statistically significant intergroup differences based on criterion χ^2 : p_{1-2} — differences between groups I and II; p_{1-3} — differences between groups I and III; p_{2-3} — differences between groups II and III.

Таблица 5. Ретроспективный анализ клинических проявлений в постковидном периоде в группах исследования

Table 5. Retrospective analysis of clinical manifestations in the post-COVID period in the study groups

Клинические проявления Clinical manifestations	Группы исследования Study groups			Всего Total n = 130	p
	I группа I group n = 52	II группа II group n = 45	III группа III group n = 33		
Усталость, слабость Fatigue, weakness	63,5% (33)	53,3% (24)	69,7% (23)	61,5% (80)	$p_{1-2} = 0,3$ $p_{1-3} = 0,64$ $p_{2-3} = 0,14$
Головная боль Headache	34,6% (18)	37,8% (17)	45,5% (15)	38,5% (50)	$p_{1-2} = 0,83$ $p_{1-3} = 0,36$ $p_{2-3} = 0,43$
Головокружение Dizziness	36,5% (19)	37,8% (17)	57,6% (19)	42,3% (55)	$p_{1-2} = 1$ $p_{1-3} = 0,06$ $p_{2-3} = 0,08$
Боль в грудной клетке Chest pain	30,8% (16)	35,6% (16)	42,4% (14)	35,4% (46)	$p_{1-2} = 0,6$ $p_{1-3} = 0,27$ $p_{2-3} = 0,54$
Одышка Dyspnoea	71,2% (37)	53,3% (24)	75,8% (25)	66,1% (86)	$p_{1-2} = 0,07$ $p_{1-3} = 0,64$ $p_{2-3} = 0,043$
Кашель Cough	46,2% (24)	42,2% (19)	48,5% (16)	45,4% (59)	$p_{1-2} = 0,7$ $p_{1-3} = 0,83$ $p_{2-3} = 0,59$
Боль в суставах и мышцах Joint and muscle pain	75,0% (39)	48,9% (22)	75,8% (25)	66,1% (86)	$p_{1-2} = 0,008$ $p_{1-3} = 0,94$ $p_{2-3} = 0,017$
Аносмия Anosmia	26,9% (14)	26,7% (12)	18,2% (6)	24,6% (32)	$p_{1-2} = 0,97$ $p_{1-3} = 0,35$ $p_{2-3} = 0,38$
Заложенность и отделяемое из носа Nasal congestion and secretion	51,9% (27)	48,9% (22)	54,5% (18)	51,5% (67)	$p_{1-2} = 0,76$ $p_{1-3} = 0,81$ $p_{2-3} = 0,62$
Дисгевзия Dysgeusia	26,9% (14)	26,7% (12)	18,2% (6)	24,6% (32)	$p_{1-2} = 0,97$ $p_{1-3} = 0,35$ $p_{2-3} = 0,38$
Снижение аппетита Loss of appetite	26,9% (14)	22,2% (10)	21,2% (7)	23,8% (31)	$p_{1-2} = 0,6$ $p_{1-3} = 0,55$ $p_{2-3} = 0,91$
Нарушения стула Altered defecation pattern	30,8% (16)	40,0% (18)	33,3% (11)	34,6% (45)	$p_{1-2} = 0,34$ $p_{1-3} = 0,8$ $p_{2-3} = 0,55$
Сухость и покраснение глаз Eye dryness and redness	28,8% (15)	26,7% (12)	21,2% (7)	26,1% (34)	$p_{1-2} = 0,81$ $p_{1-3} = 0,43$ $p_{2-3} = 0,58$
Выпадение волос Hair loss	34,6% (18)	35,6% (16)	42,4% (14)	36,9% (48)	$p_{1-2} = 0,92$ $p_{1-3} = 0,46$ $p_{2-3} = 0,54$
Снижение памяти, внимания Hypomnesia	34,6% (18)	26,7% (12)	30,3% (10)	30,7% (40)	$p_{1-2} = 0,4$ $p_{1-3} = 0,68$ $p_{2-3} = 0,72$
Тревожность Anxiety	36,5% (19)	37,8% (17)	39,4% (13)	37,7% (49)	$p_{1-2} = 0,9$ $p_{1-3} = 0,8$ $p_{2-3} = 0,88$
Повышение температуры тела Body temperature rise	21,2% (11)	8,9% (4)	0,0% (0)	11,5% (15)	$p_{1-2} = 0,09$ $p_{1-3} = 0,005$ $p_{2-3} = 0,08$

Примечание. % (n) — абсолютные и относительные показатели данных у обследованных больных; статистически достоверные межгрупповые различия по критерию χ^2 : p_{1-2} — различия между группами I и II; p_{1-3} — различия между группами I и III; p_{2-3} — различия между группами II и III.
 Note. % (n) — absolute and relative data in patients examined; statistically significant intergroup differences based on criterion χ^2 : p_{1-2} — differences between groups I and II; p_{1-3} — differences between groups I and III; p_{2-3} — differences between groups II and III.

Ретроспективный анализ клинических проявлений постковидного периода у наблюдаемых пациентов в группах исследования. При анализе наиболее распространенных клинических проявлений в постковидный период на основании клинического осмотра, данных анамнеза и проведенного анкетирования выявлены наиболее часто встречающиеся симптомы в группах наблюдения (табл. 5).

Среди клинических проявлений у пациентов I группы достоверно чаще выявлена боль в суставах и мышцах (39/75,0%) в сравнении с больными II группы (22/48,9%; $\chi^2 = 7,047$, $p = 0,008$), а повышение температуры тела отмечалось у 11/21,2% больных, тогда как в III группе данный симптом отсутствовал (0/0,0%; $\chi^2 = 8,018$, $p = 0,005$).

Оценка постковидных проявлений в III группе в сравнении со II группой выявила преобладание одышки (75,8 и 53,3% соответственно; $\chi^2 = 4,099$, $p = 0,043$), а также болей в суставах и мышцах (75,8 против 48,9% соответственно; $\chi^2 = 5,739$, $p = 0,017$).

Несмотря на отсутствие статистически значимых отличий в сравниваемых группах, в III группе в подавляющем большинстве случаев среди клинических проявлений также отмечены усталость и слабость, головная боль и головокружение, боль в грудной клетке, кашель, заложенность и отделяемое из носа, выпадение волос и тревожность.

Выявленные в нашем исследовании симптомы постковидного периода соответствуют данным других авторов. Так, в исследовании, проведенном группой британских ученых, было показано, что практически 70% наблюдаемых больных имели нарушения одной или нескольких систем организма. Наиболее часто отмечалась патология со стороны респираторной, кардиоваскулярной систем и желудочно-кишечного тракта. Среди всего многообразия клинических проявлений наиболее продолжительными и часто встречавшимися являлись астенические проявления, а также скелетно-мышечная боль, одышка [18]. В исследовании под руководством E. Cirulli вышеуказанные данные получили подтверждение. Также было установлено, что нарушение обоняния и вкуса, рассеянность внимания и расстройство памяти, одышка, дискомфорт в области грудной клетки с большей частотой отмечались в период реконвалесценции после коронавирусной инфекции [16].

Сопоставляя течение острого периода инфекционного процесса и клиническую симптоматику в постковидный период в группах исследования установлено, что anosmia, повышение температуры тела и нарушение стула являлись наиболее распространенными симптомами. В III группе головокружение ($\chi^2 = 3,911$, $p = 0,048$), боль в груди ($\chi^2 = 9,587$, $p = 0,002$) и одышка ($\chi^2 = 8,932$, $p = 0,003$) были зарегистрированы как в период разгара инфекции, так и после нее. Согласно

данным, имеющимся на текущий момент, сохранение ряда симптомов и поражение многих органов и систем, то есть развитие полиорганной патологии, являются следствием комплекса механизмов, вызванных вирусом SARS-CoV-2 [14, 26].

Исследование sIgA у наблюдаемых групп пациентов. Для исследования sIgA в образцах слюны и соскобах со слизистой носоглотки была определена условная норма изучаемых показателей и на основании этих данных произведена оценка иммунологических параметров в группах исследования (табл. 6).

Анализ sIgA в образцах слюны больных I группы, получавших профилактическую терапию препаратом IFN α -2b, отразил статистически значимое повышение его уровня в сравнении с исходными показателями: с $1,84 \pm 0,28$ до $5,78 \pm 1,96$ мг/мл, $p = 0,001$. Полученные данные при исследовании параметров у пациентов III группы, также находившихся на терапии интраназальным интерфероном, не показали статистически значимых отличий, при этом выявлено незначительное повышение уровня sIgA в сопоставлении с первоначальными данными.

При анализе соскобов эпителиальных клеток со слизистой носоглотки у лиц в I группе, находящихся на профилактической терапии с препаратом IFN α -2b, определено достоверное повышение уровня sIgA: с $28,61 \pm 3,0$ до $39,83 \pm 3,85$ мг/мл, $p = 0,007$.

В ходе исследования группы больных без профилактической терапии полученные результаты об уровнях sIgA в образцах слюны и назальных смывах отразили стойко сохраняющиеся сниженные показатели изучаемых параметров на протяжении 9 месяцев постинфекционного периода.

При сравнении изучаемых параметров между группами в зависимости от проведения профилактической терапии выявлено статистически достоверное увеличение показателей sIgA в назальных смывах у лиц, получавших интраназально препарат IFN α -2b во всех временных интервалах периода наблюдения в сравнении с группой лиц без терапии.

При анализе результатов проведенного анкетирования у лиц, получавших терапию препаратом IFN α -2b, со времени назначения и за весь период профилактического лечения не было зарегистрировано случаев респираторных инфекций. Напротив, среди респондентов без интерферонотерапии заболевания выявлены в 27,6% случаев (18/65), $\chi^2 = 20,893$, $p < 0,001$. Нежелательных явлений у наблюдаемых пациентов обеих групп не зафиксировано.

Таким образом, в нашем исследовании проанализирована возможность использования препарата IFN α -2b в периоде реконвалесценции после перенесенной коронавирусной инфекции. Критерием оценки местного иммунного ответа на использование препарата IFN α -2b послужил

Таблица 6. Показатели секреторного иммуноглобулина А в группах исследования, мг/мл

Table 6. Secretory immunoglobulin A level in study groups, mg/ml

Участки взятия материала; группы Material sampling sites; groups		Группа на терапии Group on therapy		Группа без терапии Group without therapy		Группа контроля Control group
		Исходно Baseline	Через 30 дней 30 days later	Исходно Baseline	Через 30 дней 30 days later	
sIgA слюны sIgA saliva	I	1,84±0,28	5,78±1,96*	3,08±0,735	2,36±0,56	6,45±1,81
	II	2,83±0,71	3,33±1,78	2,8±0,53	2,13±0,43	
	III	3,53±0,45	4,76±2,3	2,08±0,86	2,16±0,66	
sIgA назальный sIgA nasal	I	28,61±3,0	39,83±3,85*.*	28,33±2,44	15,66±1,32	13,43±3,24
	II	31,22±3,91	31,76±2,97#	16,12±1,62	10,58±1,03	
	III	37,06±5,74	36,89±4,33#	27,11±2,61	10,23±1,07	

Примечание. Статистически достоверные различия в сравнении до и после профилактической терапии внутри группы: * — $p < 0,05$; статистически достоверные межгрупповые различия: # — $p < 0,001$.

Note. In-group significant differences comparing baseline and post-prophylactic therapy timepoints: * — $p < 0.05$; significant intergroup differences: # — $p < 0.001$.

один из мукозальных параметров, а именно, концентрация sIgA в слюне и назальных соскобах у больных после коронавирусной инфекции в зависимости от времени, прошедшего после заболевания. Интраназальное применение препарата IFN α -2b в периоде реабилитации после COVID-19 продемонстрировало клиническую эффективность в виде отсутствия наслоения ОРИ. Анализ результатов оценки мукозального иммунитета показал статистически достоверный прирост более чем в 3 раза уровня sIgA в слюне и 1,5 раза в назальных смывах в группе лиц, находившихся на этапе реабилитации с IFN α -2b в первые 3 месяца, прошедшие после заболевания. Проведенные исследования показали, что при стимуляции мукозального иммунитета в ближайшие сроки после окончания заболевания, минимизируются риски развития других респираторных заболеваний. Месяц после инфекционного процесса оказался критическим по снижению уровня одного из факторов мукозального иммунитета, а именно sIgA, что подчеркивает его значимость в обеспечении защиты пациентов в самые ранние сроки.

При более поздних сроках после перенесенного COVID-19 у лиц, прошедших курс реабилитации с препаратом IFN α -2b, отмечаются умеренно повышенные показатели sIgA, в сравнении с исходными данными, практически до верхних значений условной нормы и клинически сохраняющийся защитный эффект в виде отсутствия респираторных заболеваний в постинфекционный период.

В группе лиц, не получавших профилактическую терапию препаратом IFN α -2b в период реабилитации, выявлено снижение показателей мукозального иммунитета, подтвержденного значениями sIgA, из чего можно заключить, что данная категория лиц подвержена более высокому риску других респираторных патологий, что и отмечалось в аналогичный период наблюдения.

Заключение

В период после перенесенной коронавирусной инфекции отмечают хронически протекающие полиорганные нарушения, влияющие на качество жизни. Развитие симптомокомплекса постковидного синдрома является сложным процессом, а клинические проявления достаточно разнообразны, следовательно, необходим тщательный мониторинг данной категории больных.

Лица, перенесшие коронавирусную инфекцию, имеют сниженные показатели одного из компонентов мукозального иммунитета — sIgA, что с большой вероятностью является фактором риска развития других респираторных инфекций.

В период реабилитации при интраназальном применении препарата IFN α -2b наиболее выраженное восстановление sIgA в слюне и соскобах эпителии носоглотки до нормальных значений наблюдалось у больных в первые 3 месяца после перенесенной коронавирусной инфекции.

Назначение препарата IFN α -2b в форме геля пациентам в постковидном периоде позволяет в сроке до 9 месяцев (период наблюдения) после заболевания поддерживать нормальные значения sIgA и предупреждать развитие респираторных инфекционных патологий.

В группах лиц после COVID-19, не прошедших курсовое лечение препаратом IFN α -2b, sIgA имеет тенденцию к снижению, а также отмечено наслоение респираторных инфекций в постковидном периоде.

Установленная клинко-иммунологическая эффективность интраназального использования препарата IFN α -2b может позволить рекомендовать его в качестве нормализации мукозального иммунитета и профилактики респираторных заболеваний в периоде реабилитации лицам, перенесшим новую COVID-19 инфекцию.

Список литературы/References

1. Вакцинация и экстренная иммунопрофилактика инфекционных заболеваний у беременных и кормящих женщин: рук. для врачей; 1-е изд. Под ред. М.П. Костинова, Л.В. Адамяна, А.П. Черданцева, Н.А. Озерецковского. М.: Группа МДВ, 2022. 98 с. [Vaccination and emergency immunoprophylaxis of infectious diseases in pregnant and lactating women: a guide for doctors; 1st ed. Eds. M.P. Kostinov, L.V. Adamyan, A.P. Cherdantsev, N.A. Ozeretskovsky. Moscow: MDV Group, 2022. 98 p. (In Russ.)]
2. Иммунокоррекция в педиатрии: практ. рук. для врачей. Под ред. М.П. Костинова. М.: Медицина для всех, 1997. 111 с. [Immunocorrection in pediatrics. A practical guide for doctors. Ed.: M.P. Kostinov. Moscow: Medicine for All. 1997. 111 p. (In Russ.)]
3. Костинов М.П. Иммунопатогенные свойства SARS-CoV-2 как основа для выбора патогенетической терапии // Иммунология. 2020. Т. 41, № 1. С. 83–91. [Kostinov M.P. Immunopathogenic properties of SARS-COV-2 as a basis for the choice of pathogenetic therapy. *Immunologiya = Immunologiya*, 2020, vol. 41, no. 1, pp. 83–91. (In Russ.)] doi: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-83-91
4. Костинов М.П. Основы иммунореабилитации при новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Пособие для врачей. М.: Группа МДВ, 2020. 112 с. [Kostinov M.P. Fundamentals of immunorehabilitation in new coronavirus infection (COVID-19). Physician's Manual. Moscow: MDV Group, 2020, 112 p. (In Russ.)]
5. Костинов М.П., Свитич О.А., Маркелова Е.В. Потенциальная иммунопрофилактика COVID-19 у групп высокого риска инфицирования. Временное пособие для врачей. М.: Группа МДВ, 2020. [Kostinov M.P., Svitich O.A., Markelova E.V. Potential COVID-19 immunization in high-risk groups. Provisional guide for physicians. Moscow: MDV Group, 2020. (In Russ.)]
6. Крюкова Н.О., Ракунова Е.Б., Костинов М.П., Баранова И.А., Свитич О.А. Секреторный иммуноглобулин А респираторной системы и COVID-19 // Пульмонология. 2021. Т. 31, № 6. С. 792–798. [Kryukova N.O., Rakunova E.B., Kostinov M.P., Baranova I.A., Svitich O.A. Secretory immunoglobulin A of the respiratory system and COVID-19. *Pulmonologiya = Pulmonologiya*, 2021, vol. 31, no. 6, pp. 792–798 (In Russ.)] doi: 10.18093/0869-0189-2021-31-6-792-798
7. Мукозальный иммунитет у пациентов с COVID-19: лечение и реабилитация / Под ред. А.Г. Чучалина, О.А. Свитич, М.П. Костинова. М.: Группа МДВ, 2022. 128 с. [Mucosal immunity in patients with COVID-19: treatment and rehabilitation. Eds. A.G. Chuchalin, O.A. Svitich, M.P. Kostinov. Moscow: Group MDV, 2022. 128 p. (In Russ.)] doi: 10.1080/17512433.2021.1902303
8. Оспельникова Т.П., Левицкая Д.С., Колодяжная Л.В., Шитова А.Д., Осипцов В.Н., Арифиллина Л.Р., Крюкова Н.О., Пахомов Д.В., Хромова Е.А., Баранова И.А., Чучалин А.Г., Костинов М.П., Свитич О.А. Биологическая активность интерферонов при новой коронавирусной инфекции COVID-19 // Вопросы вирусологии. 2022. Т. 67, № 2. С. 142–152. [Ospelnikova T.P., Levitskaya D.S., Kolodyazhnaya L.V., Shitova A.D., Osiptsov V.N., Arifullina L.R., Kryukova N.O., Pakhomov D.V., Khromova E.A., Baranova I.A., Chuchalin A.G., Kostinov M.P., Svitich O.A. Biological activity of interferons in the novel coronavirus infection COVID-19. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*, 2022, vol. 67, no. 2, pp. 142–152. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-99
9. Респираторная медицина. Руководство: в 3 томах / Под ред. А.Г. Чучалина. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ЛитТерра, 2017. Т. 2. 544 с. [Respiratory medicine. Guidelines; in 3 vol. / Ed. A.G. Chuchalin. Moscow: LitTerra, 2017. Vol. 2. 544 p. (In Russ.)]
10. Хасанова А.А., Костинов М.П., Соловьева И.Л., Жукова Е.Ю., Лушина Е.С. Заболеваемость и популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 населения Ульяновской области в эпидемический сезон COVID-19 // Медицинский вестник МВД. 2022. Т. 3, № 118. С. 67–71. [Khasanova A., Kostinov M., Soloveva I., Zhukova E., Lushina E. Morbidity and population immunity to SARS-CoV-2 in the population of the Ulyanovsk region in the epidemic season of COVID-19. *Meditsinskii vestnik MVD = Medical Bulletin of the Ministry of Internal Affairs*, 2022, vol. 3, no. 118, pp. 67–71. (In Russ.)] doi: 10.52341/20738080_2022_118_3_67
11. Adhikari S.P., Meng S., Wu Y.J., Mao Y.P., Ye R.X., Wang Q.Z., Sun C., Sylvia S., Rozelle S., Raat H., Zhou H. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. *Infect. Dis. Poverty*, 2020, vol. 9, no. 1: 29. doi: 10.1186/s40249-020-00646-x
12. 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: 327. doi: 10.1016/j.ijid.2020.09.016
13. Ben-Zuk N., Dechtman I.D., Henn I., Weiss L., Afriat A., Krasner E., Gal Y. Potential prophylactic treatments for COVID-19. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 7: 1292. doi: 10.3390/v13071292
14. Carfi A., Bernabei R., Landi F.; Gemelli against COVID-19 Post-Acute Care Study Group. Persistent symptoms in patients after acute COVID-19. *JAMA*, 2020, vol. 324, no. 6, pp. 603–605. doi: 10.1001/jama.2020.12603
15. Chen L., Liu H.G., Liu W., Liu J., Liu K., Shang J., Deng Y., Wei S. Analysis of clinical features of 29 patients with 2019 novel coronavirus pneumonia. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 2020, vol. 43, no. 3: E005. doi: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2020.0005
16. Cirulli E.T., Schiaboet Barrett K.M., Riffle S., Bolze A., Neveux I., Dabe S., Grzymalski J.J., Lu James T., Washington N.L. Long-term COVID-19 symptoms in a large unselected population. *Infect. Dis. (Lond.)*, 2021, vol. 53, no. 10, pp. 737–754. doi: 10.1101/2020.10.07.20208702
17. Davido B., Seang S., Tubiana R., de Truchis P. Post-COVID-19 chronic symptoms: a postinfectious entity? *Clin. Microbiol. Infect.*, 2020, vol. 26, no. 11, pp. 1448–1449. doi: 10.1016/j.cmi.2020.07.028
18. Dennis A., Wamil M., Alberts J., Oben J., Cuthbertson D.J., Wootton D., Crooks M., Gabbay M., Brady M., Hishmeh L., Attree E., Heightman M., Banerjee R., Banerjee A.; COVERSCAN study investigators. Multiorgan impairment in low-risk individuals with post-COVID-19 syndrome: a prospective, community-based study. *BMJ Open*, 2021, vol. 11, no. 3: e048391. doi: 10.1136/bmjopen-2020-048391
19. Dos Santos J.M.B., do Amaral J.B., França C.N., Monteiro F.R., Alvares-Saraiva A.M., Kalil S., Durigon E.L., Oliveira D.B.L., Rodrigues S.S., Heller D., Welter E.A.R., Pinho J.R.R., Vieira R.P., Bachi A.L.L. Distinct immunological profiles help in the maintenance of salivary secretory IgA production in mild symptoms COVID-19 patients. *Front. Immunol.*, 2022, vol. 13: 890887. doi: 10.3389/fimmu.2022.890887

20. 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
21. Holshue M.L., DeBolt C., Lindquist S., Lofy K.H., Wiesman J., Bruce H., Spitters C., Ericson K., Wilkerson S., Tural A., Diaz G., Cohn A., Fox L., Patel A., Gerber S.I., Kim L., Tong S., Lu X., Lindstrom S., Pallansch M.A., Weldon W.C., Biggs H.M., Uyeki T.M., Pillai S.K.; Washington State 2019-nCoV Case Investigation Team. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 382, no. 10, pp. 929–936. doi: 10.1056/NEJMoa2001191
22. Hosseini Seyed E., Kashani Riahi N., Nikzad H., Azadbakht J., Hassani Bafrani H., Kashani Haddad H. The novel coronavirus Disease-2019 (COVID-19): mechanism of action, detection and recent therapeutic strategies. *Virology*, 2020, vol. 551, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.virol.2020.08.011
23. King C., Sprent J. Dual nature of type I interferons in SARS-CoV-2-induced inflammation. *Trends Immunol.*, 2021, vol. 42, no. 4, pp. 312–322. doi: 10.1016/j.it.2021.02.003
24. Liu K., Fang Y.Y., Deng Y., Liu W., Wang M.F., Ma J.P., Xiao W., Wang Y.N., Zhong M.H., Li C.H., Li G.C., Liu H.G. C. Clinical characteristics of novel coronavirus cases in tertiary hospitals in Hubei Province. *Chin. Med.*, 2020, vol. 133, no. 9, pp. 1025–1031. doi: 10.1097/CM9.0000000000000744
25. Russell M.W., Moldoveanu Z., Ogra P.L., Mestecky J. Mucosal immunity in COVID-19: a neglected but critical aspect of SARS-CoV-2 infection. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11: 611337. doi: 10.3389/fimmu.2020.611337
26. Tenforde M.W., Kim S.S., Lindsell C.J., Billig Rose E., Shapiro N.I., Files D.C., Gibbs K.W., Erickson H.L., Steingrub J.S., Smithline H.A., Gong M.N., Aboodi M.S., Exline M.C., Henning D.J., Wilson J.G., Khan A., Qadir N., Brown S.M., Peltan I.D., Rice T.W., Hager D.N., Ginde A.A., Stubblefield W.B., Patel M.M., Self W.H., Feldstein L.R.; IVY Network Investigators; CDC COVID-19 Response Team; IVY Network Investigators. Symptom duration and risk factors for delayed return to usual health among outpatients with COVID-19 in a multistate health care systems network — United States, March–June 2020. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2020, vol. 69, no. 30, pp. 993–998. doi: 10.15585/mmwr.mm6930e1
27. Tolba K.M., Omirah M.A., Hussein A., Saeed H. Assessment and characterization of post-COVID-19 manifestations. *Int. J. Clin. Pract.*, 2021, vol. 75, no. 3: e13746. doi: 10.1111/IJCP.13746
28. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 2020, vol. 181, no. 2, pp. 281–292.e6 doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058
29. Wang D., Hu B., Hu C., Zhu F., Liu X., Zhang J., Wang B., Xiang H., Cheng Z., Xiong Y., Zhao Y., Li Y., Wang X., Peng Z. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 2020, vol. 323, no. 11, pp. 1061–1069. doi: 10.1001/jama.2020.1585
30. Wang Z., Lorenzi J.C.C., Muecksch F., Finkin S., Viant C., Gaebler C., Cipolla M., Hoffmann H.H., Oliveira T.Y., Oren D.A., Ramos V., Nogueira L., Michailidis E., Robbiani D.F., Gazumyan A., Rice C.M., Hatzioannou T., Bieniasz P.D., Caskey M., Nussenzweig M.C. Enhanced SARS-CoV-2 neutralization by dimeric IgA. *Sci. Transl. Med.*, 2021, vol. 13, no. 577: eabf1555. doi: 10.1126/scitranslmed.abf1555
31. Yang Y., Lu Q., Liu M., Wang Y., Zhang A., Jalali N., Dean E.N., Longini I., Halloran E., Xu B., Zhang X., Wang L., Liu W., Fang L. Epidemiological and clinical features of the 2019 novel coronavirus outbreak in China. *medRxiv*, 2020. doi: 10.1101/2020.02.10.20021675
32. Zhang J.J., Dong X., Cao Y.Y., Yuan Y.D., Yang Y.B., Yan Y.Q., Akdis C.A., Gao Y.D. Clinical characteristics of 140 patients infected by SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*, 2020, vol. 75, no. 7, pp. 1730–1741. doi: 10.1111/all.14238

Авторы:

Хасанова А.А., аспирант кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВПО Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск, Россия;

Костинов М.П., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; зав. кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Соловьева И.Л., д.м.н., профессор кафедры педиатрии ФГБОУ ВПО Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск, Россия;

Никитина Т.Н., к.м.н., главный эксперт управления аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва, Россия;

Хромова Е.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Khasanova A.A., Postgraduate Student, Department of Infectious Diseases, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation;

Kostinov M.P., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Head of the Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Soloveva I.L., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Pediatrics, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation;

Nikitina T.N., PhD (Medicine), Head Expert of the Allergens, Cytokines and Other Immunomodulators, Department of the Center for Examination and Control of Medical Immunobiological Preparations, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Khromova E.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

EVALUATING THE IATROGENIC EFFECTS OF POLYPHARMACY AND DRUG INTERACTIONS IN HIV-POSITIVE PATIENTS ADMITTED TO THE INTENSIVE CARE UNIT: A SINGLE-CENTER RETROSPECTIVE STUDY

K.C. Emerole^a, S.L. Voznesenskiy^a, E.S. Samotolkina^b, G.M. Kozhevnikova^a, P.V. Klimkova^b

^a Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation

^b Infectious Disease Clinical Hospital No. 2, Moscow, Russian Federation

Abstract. *Background.* Polypharmacy and drug interactions are of particular concern in people living with HIV/AIDS, especially those who receive antiretroviral therapy (ARVs). Polypharmacy and drug-drug interactions (DDIs) can impact the efficacy and toxicity of HIV treatment. ARVs used in HIV treatment are often prone to drug interactions if administered with other non-ARV drugs because many of them are metabolized through the cytochrome P450 system. The pharmacological management of HIV patients in the intensive care unit (ICU) is usually complex and typically involves the administration of several classes of drugs. This patient group may be at higher risk for potential DDIs due to polypharmacy in the ICU. The main objective of this study was to assess the iatrogenic effects of polypharmacy in HIV patients treated in the ICU and to describe the DDI profile between ARVs and other non-ARV medications prescribed in the ICU. *Methods and materials.* Between 2018 and 2020, we conducted a single-center, retrospective study evaluating the medical records of 59 HIV patients admitted to the ICU for more than 24 hours at the Infectious Disease Clinical Hospital No. 2, Moscow, Russia. We evaluated the impact of polypharmacy on renal, hepatic and haemopoietic function. The Liverpool HIV Drug Interaction database was used to identify DDIs in ART-treated HIV patients. *Results.* All patients received more than 5 different medications matching the definition of polypharmacy. The average number of concurrent medications prescribed was 15 ± 6.713 (maximum — 40, minimum — 6). All drug interactions recorded were between ARVs and antibiotics: 30 cases of potential interactions in 65.5% patients who received ARV. Of such patients, 94% were exposed to at least two potential interactions. Tenofovir (TDF) and the antibiotic vancomycin underlaid the most common potential interaction (49.2%), followed by lopinavir ritonavir (LPV/RTV) and ciprofloxacin (30.3%). A significant difference in average creatinine levels was found in patients with TDF/vancomycin potential interactions ($p < 0.05$). *Conclusion.* This study demonstrated that potential DDIs frequently occur in ICU patients in line with previous investigations. It is necessary to implement collaborations among clinical pharmacologists and infectious disease/HIV specialists, as well as frequent clinical and laboratory monitoring, aimed at developing effective and actionable strategies that could reduce potential DDIs in HIV patients in the ICU.

Key words: HIV infection, acquired immunodeficiency syndrome, polypharmacy, medications, drug-drug interactions, intensive care unit.

Адрес для переписки:

Емероле Карл Чуквуемека
117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6,
Российский университет дружбы народов.
Тел.: 8 (925) 203-23-24.
E-mail: emerole_k@pfur.ru

Contacts:

Karl Chukwuemeka Emerole
117198, Russian Federation, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 6,
RUDN University.
Phone: +7 (925) 203-23-24.
E-mail: emerole_k@pfur.ru

Для цитирования:

Емероле К.С., Вознесенский С.Л., Самотолкина Е.С., Кожевникова Г.М., Климкова П.В. Оценка ятрогенных эффектов полипрагмазии и лекарственных взаимодействий у больных ВИЧ-инфекцией в отделении интенсивной терапии: одноцентровое ретроспективное исследование // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1123–1128. doi: 10.15789/2220-7619-ETI-1942

Citation:

Emerole K.C., Voznesenskiy S.L., Samotolkina E.S., Kozhevnikova G.M., Klimkova P.V. Evaluating the iatrogenic effects of polypharmacy and drug interactions in HIV-positive patients admitted to the intensive care unit: a single-center retrospective study // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1123–1128. doi: 10.15789/2220-7619-ETI-1942

ОЦЕНКА ЯТРОГЕННЫХ ЭФФЕКТОВ ПОЛИПРАГМАЗИИ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ В ОТДЕЛЕНИИ ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ: ОДНОЦЕНТРОВОЕ РЕТРОСПЕКТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Емероле К.Ч.¹, Вознесенский С.Л.¹, Самотолкина Е.С.², Кожевникова Г.М.¹, Климкова П.В.²

¹ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

² ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 2 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Полипрагмазия и лекарственные взаимодействия вызывают особую озабоченность у людей, живущих с ВИЧ, особенно у тех, кто получает антиретровирусные препараты (АРВП). Полипрагмазия и лекарственные взаимодействия могут влиять на эффективность и безопасность антиретровирусной терапии. АРВП часто вступают во взаимодействие с другими лекарственными средствами, поскольку многие из них метаболизируются через систему цитохрома P450. Фармакотерапия ВИЧ-инфицированных пациентов в отделении интенсивной терапии (ОИТ) обычно включает введение нескольких классов препаратов. Такая группа пациентов может подвергаться более высокому риску потенциального межлекарственного взаимодействия. Целью исследования была оценка ятрогенных эффектов полипрагмазии у ВИЧ-инфицированных пациентов, госпитализированных в ОИТ инфекционного стационара, и описание профиля лекарственных взаимодействий между АРВП и другими классами препаратов, назначаемыми в ОИТ. *Материалы и методы.* Проведено ретроспективное исследование историй болезни 59 ВИЧ-инфицированных пациентов, находившихся в ОИТ более 24 часов в 2018–2020 гг. в ГБУЗ ИКБ № 2 ДЗМ. Оценивалось влияние полипрагмазии на почечную, печеночную и кроветворную функции. Использовался онлайн-сервис «Ливерпульская база данных (Liverpool HIV Drug Interaction database)» для выявления различных межлекарственных взаимодействий возможных при терапии ВИЧ/СПИДа. *Результаты.* Все пациенты получали более 5 различных препаратов, что соответствует определению полипрагмазии. Среднее количество одновременно назначаемых препаратов составило $15 \pm 6,713$, максимум 40, минимум 6. Все зарегистрированные лекарственные взаимодействия были между АРВП и антибактериальными препаратами: зафиксировано 30 случаев потенциальных взаимодействий у 65,5% пациентов, получавших АРВП. 94% из этих пациентов подвергались как минимум двум потенциальным взаимодействиям. Сочетание тенофовира (TDF) и ванкомицина было наиболее частым зарегистрированным потенциальным взаимодействием (49,2%), за ним следовали лопинавир/ритонавир (LPV/r) и ципрофлоксацин (30,3%). Среднее значение показателя креатинина было выше у пациентов, у которых наблюдалось потенциальное взаимодействие TDF и ванкомицина ($345,7 \pm 45,2$ ммоль/л), чем у тех пациентов, которые не получали TDF и ванкомицин ($107,5 \pm 33,5$ ммоль/л), $p < 0,05$. *Выводы.* Это исследование продемонстрировало, что потенциальные лекарственные взаимодействия часто возникают у ВИЧ-инфицированных пациентов в отделении интенсивной терапии, как сообщалось в других исследованиях. Необходимо осуществлять сотрудничество между клиническим фармакологом и врачом-инфекционистом, а также регулярный клинико-лабораторный мониторинг для разработки эффективных и действенных стратегий с целью снижения рисков межлекарственных взаимодействий у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих лечение в ОИТ.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, синдром приобретенного иммунодефицита, полипрагмазия, лекарственные препараты, лекарственные взаимодействия, отделение интенсивной терапии.

Introduction

Polypharmacy refers to the use of multiple medications in a patient. Numerically or based on the number of medications prescribed, there is no universally agreed definition of polypharmacy, however it can be described in three groups: excessive polypharmacy (use of 10 or more different drugs); polypharmacy (use of 5 to 9 different drugs); and no polypharmacy (use of 0 to 4 different drugs). The use of multiple medications can have a negative effect of treatment and medication adherence. One challenge associated with polypharmacy is drug-drug interaction, which is often a serious complication of taking multiple medications; it accounts for 3% to 5% of all in-hospital medication errors [1]. The consequences of drug interactions vary, ranging

from drug toxicities to a reduction in therapeutic effects. These consequences could lead to inadequate treatment of the targeted disease, damage to vital organ systems, or death.

Polypharmacy and drug interactions are of particular concern in people living with HIV/AIDS (PLWHA), especially those who are receiving antiretroviral therapy (ARVs), though ARV naïve patients are also at risk for polypharmacy and drug interactions. PLWHA from regions with low antiretroviral therapy coverage due to limited resources may not achieve sustained viral suppression, putting them at risk for episodic illnesses, hospitalization, or ICU admission with severe forms of disease. Such events would subsequently lead to indiscriminate and uncontrolled use of medication, polypharmacy, and drug-interactions. Polypharmacy and drug-drug in-

teractions (DDIs) can impact the efficacy and toxicity of HIV treatment.

ARVs used in the treatment of HIV are often prone to drug interactions if administered with other non-antiretroviral drugs because many of them are metabolized through enzyme-catalyzed processes. Antiretroviral therapy and other medical therapies for HIV-related infections have been associated with toxicities. Antiretroviral therapy can contribute to renal dysfunction directly by inducing acute tubular necrosis, acute interstitial nephritis, crystal nephropathy, or renal tubular disorders. They can also occur indirectly via drug interactions. The most well-recognized DDI mechanism is that many ARVs, especially pharmacologic boosters (ritonavir) frequently lead to significant drug interactions since they may affect the drug-metabolizing enzyme system or drug transporters as inhibitors. Medications used to treat comorbidities or co-infections, various supplements, and legal or illegal drugs that inhibit or induce the drug-metabolizing enzyme system can lead to organ damage and toxicity to the human body [1].

Persons with end stage HIV/AIDS are considered critically ill and are frequently admitted (ICU). The pharmacological management of these patients is usually complex and typically involves the administration of multiple drugs of different pharmacological classes due to life threatening illnesses which may be fatal. HIV patients treated at the ICU may also be at higher risk for DDIs due to polypharmacy. In the ICU, most patients with end stage HIV/AIDS present with HIV-related cachexia. Altered body composition and plasma protein concentration may affect drug distribution and induce drug toxicity in these patients [2, 3, 4, 9, 11, 17]. Other factors like prolonged intensive care unit length of stay, age, and death outcome are associated with increased medication administration. Studying the prescription patterns of ICU patients can clarify drug usage patterns in this setting; this is essential for creating favorable conditions for wide scale improvements in therapeutic practices.

To our knowledge, a study that evaluates polypharmacy and drug interactions in people living with HIV/AIDS and the impact on organ functions has never been conducted in Russia. Therefore, the main objectives of this study were: to assess the iatrogenic effects of polypharmacy in HIV patients treated in the ICU; to describe the DDI profile between antiretrovirals (ARVs) and other medications prescribed in the ICU, while evaluating their prevalence; and to classify DDIs as clinically or potentially significant [6, 14, 15, 16].

Materials and methods

A retrospective study was conducted from 2018 to 2020 at the Infectious Disease Clinical Hospital No. 2, Moscow, Russia. We evaluated the medical records of 59 HIV patients who were admitted to the

intensive Care Unit (ICU). HIV patients were included in this study: of either sex; older than 18 years; admitted to the ICU for more than 24 hours; and with patients (or their relatives) willing to give informed consent. All patients in the study group received more than 5 medications during ICU stay. Therefore, using the definition of polypharmacy presented in the introduction, patients were divided into two groups according to the number of drugs received. The first group included patients who received five to nine medication (≤ 9 medications), which was considered “polypharmacy”. The second group included patients who received ten or more medications (> 9 medications), which was considered “excess polypharmacy”.

This design was implemented to assess the impact of the number of drugs prescribed on organ function. We evaluated renal, hepatic, and haemopoietic function taking the mean values of urea, creatinine, liver enzymes, bilirubin, erythrocytes, along with WBC and platelet counts during ICU stay into consideration. Qualitative and quantitative data are expressed with mean \pm standard deviation (SD). The two-tailed Fisher’s exact chi-square test was used to evaluate differences between groups, and results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Identification of potential and clinically significant drug–drug interactions using the Liverpool HIV drug interaction database. The comprehensive University of Liverpool HIV drug interactions database, which accumulates published findings mainly from various studies, was used to determine drug–drug interaction (DDI) among HIV patients on ART. Two levels of interaction between ARVs and non-ARVs were considered in our study: 1) clinically significant drug–drug interactions revealing contraindicated combinations which could potentially leading to serious adverse events or impaired efficacy; and 2) potential drug–drug interactions wherein patients might require dosage adjustment, close monitoring, or timing-of-administration modification to minimize possible clinical consequences.

Results

We retrospectively reviewed the case records of 59 HIV patients admitted to the ICU. Of them, 74.5% (44) were male, and 25.42% were female (15), with a mean age of 47 (SD \pm 10.7) years. Most patients (81.5%) were diagnosed at HIV stage 4B according to V.I. Pokrovsky’s clinical classification of HIV infection (equivalent to CDC category C). The median duration of HIV infection was 8.4 years (IQR 3.5–10.2 years). Their median CD4 count and viral load was 100 cells/mm³ (IQR: 10–250) and 100 000 copies/ml (IQR: 50 000–500 000), respectively. Thirty patients (51%) were ART treatment naive without valid reasons. Most patients were admitted for *Staphylococcus aureus* bacteremia (44.70%) or infective endocarditis (23.42%). Chronic hepatitis B

Table 1. Comparison between polypharmacy status and demographic and patient clinical data (n = 59)

Variable	≤ 9 medications (n = 38)	> 9 medications (n = 21)	P value
Male	31	13	0.31
Female	7	8	0.7
Age	48±11.7	44±10.2	0.65
Length of ICU stay	8±8.4	6±9.7	0.88
Deaths	33	14	0.70

and C were the prevailing comorbidities, identified in 35% and 32% of patients respectively, but all patients were considered inactive carriers.

The total number of prescription drugs in the 59 records studied was 723 drugs. Out of 723 prescription drugs, 340 were injectable drugs. The first group had 38 patients with ≤ 9 medications (7.1±1.292). The remaining 21 patients received > 9 medications (17.58±9.343) and were in the second group. The maximum number of prescribed drugs was 40 (minimum 6). There was no statistically significant relationship between the number of drugs prescribed and gender, age, the length of ICU stay, or death outcome (Table 1). Our study also revealed no significant statistical difference between mean values of renal, hepatic or haemopoietic function, and the number of drugs prescribed (Table 2).

The most common non-ARV drugs used in the ICU were antibiotics (100%), antipyretics (99.21%), and antimycotics (88.71%). Among antibiotics, quinolones were most commonly used (79.13%), followed by nitroimidazole (61.25%). The University of Liverpool HIV drug interactions database indicated no cases of clinically significant interaction, but revealed cases of potential interactions among patients who received ARVs (all drug interactions recorded where between ARVs and antibiotics). We recorded 30 cases of potential interactions (Fig.) in 65.5% (19 out of 29) patients who received ARVs.

Of these patients, 94% (18) were exposed to at least two potential interactions. The ARV Tenofovir (TDF) most frequently interacted with the antibiotic vancomycin (49.2%), followed by lopinavir/ritonavir (LPV/RTV) and ciprofloxacin (30.3%).

In addition, we investigated the impact of these potential interactions on organ function, revealing a significant difference in average creatinine levels in patients who had TDF/Vancomycin interactions and patients without such interactions during ICU stay (Table 3). After further investigation of the group of patients with TDF/Vancomycin interactions, we found no statistically significant relationship between changes in average creatinine levels and demographic/clinical information including comorbidities.

Discussion

The intensive care unit is considered one of the most neglected departments with respect to drug utilization studies, yet polypharmacy and drug-drug interactions are more common in the ICU [5]. This study was intended to investigate the impact of drug interactions and polypharmacy in HIV patients admitted to the ICU. Previous studies on the subject have demonstrated not only a prevalence of drug-drug interactions with antiretrovirals in HIV outpatients, but also in HIV patients in the intensive care unit [7, 10, 12, 13, 18]. Most studies have revealed that analgesics were the most common ICU medications with ART-related potential DDIs. Our study revealed that antibiotics frequently interacted with antiretrovirals. The basis for a high prevalence of antibiotics in our study was due to a high incidence of bacterial infections in the HIV patients admitted to the ICU. In this study, there was no significant relationship between the number medications prescribed in the ICU and demographic and clinical information. This was probably due to a small sample size which we consider a limitation of the study.

Table 2. Comparison between polypharmacy and indicators of liver, renal, and haemopoietic function

	≤ 9 medications (n = 38)	> 9 medications (n = 21)	P value
ALT	41±2.3 U/L	30±9.1 U/L	0.474
AST	56±7.1 U/L	49.5±8.3 U/L	0.443
Bilirubin	15±2.1 µmol/L	13.25±6.61 µmol/L	0.76
Urea	16.7±7.2 µmol/L	13.45±5.5 µmol/L	0.343
Creatinine	221.5±31 µmol/L	207.5±17.7 µmol/L	0.358
RBC count	3.15±0.76 cells/mcL	3.1±0.75 cells/mcL	0.94
WBC count	13±1.77 cells/mcL	9±2.1 cells/mcL	0.0372
Hemoglobin count	97±13 g/L	88±20.1 g/L	0.61
Platelet count	118±21 µmol/L	105.5±17 µmol/L	0.871

Table 3. Effect of potential TDF/Vancomycin interaction on creatinine levels

	TDF/Vancomycin interaction (n = 14)	Without TDF/Vancomycin interaction (n = 45)	P value
Creatinine	345.7±45.2 µmol/L	107.5±33.5 µmol/L	p = 0.035

Our study also did not reveal any significant relationship between the number medications prescribed and organ function assays (liver, kidney and haemopoietic functions). The Liverpool HIV drug interactions database indicated that more than half of the patients (62%) on ARV were exposed to at least two potential interactions. Data revealed that tenofovir most frequently interacted with the antibiotic vancomycin, followed by lopinavir ritonavir and ciprofloxacin. The following is a summary of the potential tenofovir/vancomycin interaction according to the Liverpool HIV drug interactions database: “Coadministration has not been studied. Vancomycin is eliminated unchanged predominantly via glomerular filtration, and there is little potential for interaction with tenofovir-DF via competition for active renal transport mechanisms. However, both vancomycin and tenofovir-DF are potentially nephrotoxic and tenofovir-DF should be avoided with concurrent or recent use of a nephrotoxic agent. If concomitant use of tenofovir-DF and nephrotoxic agents is unavoidable, renal function should be monitored closely. A case study described renal failure in 2 patients taking tenofovir-DF and a prolonged course of vancomycin”.

The course of vancomycin prescription in these patients was not considered prolonged, therefore renal failure as a complication was not observed, although there was a significant difference in average creatinine levels among patients who had tenofovir/vancomycin interactions. Coadministration of lopinavir/ritonavir and ciprofloxacin was the second most common potential DDI recorded. The database (Liverpool HIV drug interaction) indicates that caution should be exercised when prescribing this combination as both drugs have risks of QT prolongation. However, we did not find significant changes from the ECG assessment of patients. We also did not observe any statistically significant relationship between changes in average creatinine levels and demographic/clinical information of patients with tenofovir/vancomycin interactions. These events were probably as a result of a small sample size, which we consider a limitation to the study.

References

1. Danielson P.B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr. Drug. Metab.*, 2002, vol. 3, no. 6, pp. 561–597. doi: 10.2174/1389200023337054
2. De Maat M.M., Ekhart G.C., Huitema A.D., Koks C.H., Mulder J.W., Beijnen J.H. Drug interactions between antiretroviral drugs and comedicated agents. *Clin. Pharmacokinet.*, 2003, vol. 42, no. 3, pp. 223–282. doi: 10.2165/00003088-200342030-00002
3. Farhoudi M., Khalili H., Karimzadeh I., Abbasian L. Associated factors of drug–drug interactions of highly active antiretroviral therapy: report from a referral center. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2015, vol. 11, no. 4, pp. 471–479. doi: 10.1517/17425255.2014.993606
4. Hughes C.A., Tseng A., Cooper R. Managing drug interactions in HIV-infected adults with comorbid illness. *CMAJ*, 2015, vol. 187, no. 1, pp. 36–43. doi: 10.1503/cmaj.131626
5. Johnston J.P., Heavner M.S., Liu M., Casal G.L.H., Akgün K.M. The prevalence of drug–drug interactions with antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus-infected patients in the intensive care unit. *J. Pharm. Pract.*, 2021: 8971900211035262. doi: 10.1177/08971900211035262

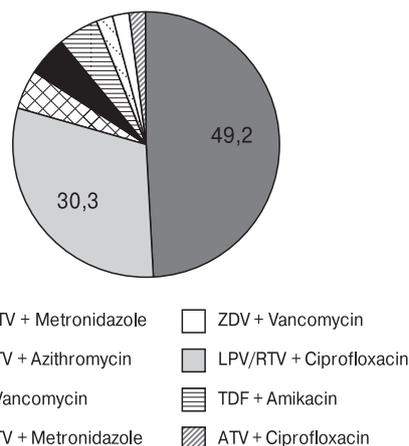


Figure. Potential antiretroviral/antibiotic interactions recorded in HIV-infected patients admitted to the ICU

Note: ATV — Atazanavir; ZDV — Zidovudine; DRV/RTV — Darunavir/Ritonavir; LPV/RTV — Lopinavir/Ritonavir; TDF — Tenofovir.

Conclusion

This study demonstrated that potential DDIs frequently occur in ICU patients, as reported in other investigations. This study also shows the importance of considering the use of an HIV drug interaction database as HIV+ ICU patients are at a high risk for polypharmacy and drug–drug interaction. It is necessary to implement collaborations among clinical pharmacologists and infectious disease/HIV specialists, as well as frequent clinical and laboratory monitoring, with the aim of developing effective and actionable strategies that could reduce potential DDIs in HIV+ ICU patients.

Acknowledgment

This paper has been supported by the RUDN University Strategic Academic Leadership Program.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

6. Kacha H.V., Mundhava S.G., Kubavat A.R. Assessment of drug use pattern, their cost and safety in emergency department at a tertiary care teaching hospital, Rajkot. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 2018, vol. 9, no. 4, pp. 1638–1643. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.9(4).1638-1643
7. López-Centeno B., Badenes-Olmedo C., Mataix-Sanjuan Á., McAllister K., Bellón J.M., Gibbons S., Balsalobre P., Pérez-Latorre L., Benedí J., Marzolini C., Aranguren-Oyazábal A., Khoo S., Calvo-Alcántara M.J., Berenguer J. Polypharmacy and drug-drug interactions in people living with human immunodeficiency virus in the region of Madrid, Spain: a population-based study. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 71, no. 2, pp. 353–362. doi: 10.1093/cid/ciz811
8. Masnoon N., Shakib S., Kalisch-Ellett L., Caughey G.E. What is polypharmacy? A systematic review of definitions. *BMC Geriatr.*, 2017, vol. 17, no. 1: 230. doi: 10.1186/s12877-017-0621-2
9. Miller C.D., El-Kholi R., Faragon J.J., Lodise T.P. Prevalence and risk factors for clinically significant drug interactions with antiretroviral therapy. *Pharmacotherapy.*, 2007, vol. 27, no. 10, pp. 1379–1386. doi: 10.1592/phco.27.10.1379
10. O'Dwyer M., Peklar J., McCallion P., McCarron M., Henman M.C. Factors associated with polypharmacy and excessive polypharmacy in older people with intellectual disability differ from the general population: a cross-sectional observational nationwide study. *BMJ Open*, 2016, vol. 6, no. 4: e010505. doi: 10.1136/bmjopen-2015-010505
11. Pal D., Kwatra D., Minocha M., Paturi D.K., Budda B., Mitra A.K. Efflux transporters- and cytochrome P-450-mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals. *Life Sci.*, 2011, vol. 88, no. 21–22, pp. 959–971. doi: 10.1016/j.lfs.2010.09.012
12. Ray S., Bhattacharyya M., Pramanik J., Todi S. Drug-drug interactions in the ICU. *Crit Care.*, 2009, vol. 13 (suppl. 1): P495. doi: 10.1186/cc7659
13. Schlaeppli C., Vanobberghen F., Sikalengo G., Glass T.R., Ndege R.C., Foe G., Kuemmerle A., Paris D.H., Battagay M., Marzolini C., Weisser M.; Kilombero and Ulanga Antiretroviral Cohort (KIULARCO) study group. Prevalence and management of drug-drug interactions with antiretroviral treatment in 2069 people living with HIV in rural Tanzania: a prospective cohort study. *HIV Med.*, 2020, vol. 21, no. 1, pp. 53–63. doi: 10.1111/hiv.12801
14. Sharma N., Parakh R., Sharma D., Sharma P., Sharma P., Sharma N. A drug utilization study in critically ill patients in a tertiary care teaching hospital in North India. *Am. J. Pharmtech. Res.*, 2014, vol. 4, no. 1, pp. 780–789. doi: 10.18203/2319-2003.ijbcp20195778
15. Shinde R.M., Kale A., Chube S., Sawant M. Drug utilization study in medical intensive care unit in a rural tertiary care teaching hospital in Maharashtra. *Int. J. Med. Sci. Public Health.*, 2017, vol. 6, no. 4, pp. 733–737. doi: 10.5455/ijmsph.2017.1165030112016
16. Smythe M.A., Melendy S., Jahns B., Dmuchowski C. An exploratory analysis of medication utilization in a medical intensive care unit. *Crit. Care Med.*, 1993, vol. 21, no. 9, pp. 1319–1323. doi: 10.1097/00003246-199309000-00014
17. Stolbach A., Paziana K., Heverling H., Pham P. A Review of the toxicity of HIV medications II: interactions with drugs and complementary and alternative medicine products. *J. Med. Toxicol.*, 2015, vol. 11, no. 3, pp. 326–341. doi: 10.1007/s13181-015-0465-0
18. Xia H., Gao L., Gong X., Zaongo S.D., Zhang T., Wu H., Ma P., Huang X. The challenge of potential drug-drug interactions among people living with HIV on antiretroviral therapy: a cross-sectional study in selected provinces in China. *Front. Pharmacol.*, 2020, vol. 11: 800. doi: 10.3389/fphar.2020.00800

Авторы:

Емероле К.Ч., к.м.н., ассистент кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;
Вознесенский С.Л., к.м.н., доцент, доцент кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;
Самотолкина Е.С., зав. отделением интенсивной терапии для больных с ВИЧ-инфекцией ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 2 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия;
Кожевникова Г.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;
Климова П.В., врач-инфекционист отделения интенсивной терапии для больных с ВИЧ-инфекцией ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 2 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия.

Authors:

Emerole K.C., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Infectious Diseases, Epidemiology and Phthiology, RUDN University, Moscow, Russian Federation;
Voznesenskiy S.L., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Epidemiology and Phthiology, RUDN University, Moscow, Russian Federation;
Samotolkina E.S., Chief Physician of the Intensive Care Unit for HIV Patients, Infectious Disease Clinical Hospital No. 2 Moscow, Russian Federation;
Kozhevnikova G.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Infectious Diseases, Epidemiology and Phthiology, RUDN University, Moscow, Russian Federation;
Klimkova P.V., Infectious Disease Physician, Intensive Care Unit for HIV Patients, Infectious Disease Clinical Hospital No. 2 Moscow, Russian Federation.

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ *CANDIDA* sp. В ТЕЧЕНИЕ СУТОК МОДИФИЦИРОВАННЫМ МАКРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

М.В. Николенко, Н.В. Барышникова, О.И. Малишевская, О.В. Еноктаева,
Е.М. Васева

ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия

Резюме. Целью исследования являлось изучение динамики биопленкообразования *Candida* sp. в течение суток модифицированным макрометрическим методом. Предложенный макрометрический метод решает задачи по ускорению и упрощению количественной оценки процесса биопленкообразования, увеличивает чувствительность, так как позволяет исключить ошибки, связанные с использованием полистиролового материала. Простота выполнения приведенной методики делает ее доступной для любой лаборатории. Для исследования использованы эталонные штаммы из американской коллекции типовых культур (ATCC) и клинические изоляты *Candida* sp., выделенные из женского репродуктивного тракта при кандидозном дисбиозе. Биопленкообразование *Candida* sp. изучали по модифицированной авторами методике O'Toole G.A. и соавт. Биологическую активность пленкообразования *Candida* sp. смотрели в течение двух суток с 4-часовым интервалом, в зимнее время года, IV фаза луны. Использовали 48-часовую культуру грибов, что соответствовало максимальной адгезии их на поверхности стекла. Хронодизайн исследований подразумевал получение по оцениваемой функции 6-ти измерений в сутки с 3–5-кратным повторением условий эксперимента. Для графического представления амплитудно-фазовых характеристик изученных биоритмов использован косинор-анализ, служащий базовым методом для выявления циклических процессов в биологических системах и их моделирования. В ходе исследования доказано, что способность клеток микромицетов к адгезии достоверно выше в стационарной фазе роста, чем логарифмической ($p < 0,05$). Используемый хронобиологический прием позволил выявить наличие пленкообразующей активности грибов в течение суток ($p < 0,05$) и обнаружить общие закономерности проявления свойств у представителей всех изучаемых видов. Экспериментально установлено, что последовательность и согласованность биологических свойств клинических изолятов *Candida* sp. во времени принципиально не зависят от вида гриба. В ходе исследования установлены ритмометрические маркеры патогенности штамма — это вклад ритма и амплитудно-фазовая характеристика. Доказано, что активность биопленкообразования увеличивается в направлении «эталонные штаммы → клинические изоляты». Критерий Манна–Уитни у *C. albicans* составил 29, *C. tropicalis* — 26, *C. krusei* — 30 ($p < 0,05$). Использование хронобиологического метода, на наш взгляд, открывает новые перспективы при изучении

Адрес для переписки:

Николенко Марина Викторовна
625023, Россия, г. Тюмень, ул. Одесская, 54,
Тюменский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 905 823-37-90 (моб.).
E-mail: nikolenko-marina@mail.ru

Contacts:

Marina V. Nikolenko
625023, Russian Federation, Tyumen, Odesskaya str., 54,
Tyumen State Medical University.
Phone: +7 905 823-37-90 (mobile).
E-mail: nikolenko-marina@mail.ru

Для цитирования:

Николенко М.В., Барышникова Н.В., Малишевская О.И., Еноктаева О.В.,
Васева Е.М. Изучение динамики биопленкообразования *Candida* sp.
в течение суток модифицированным макрометрическим
методом // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1129–1135.
doi: 10.15789/2220-7619-АНС-1929

Citation:

Nikolenko M.V., Baryshnikova N.V., Malishevskaya O.I., Enoktaeva O.V.,
Vaseva E.M. A 24-hour *Candida* sp. biofilm formation dynamically assessed
with modified macrometric method // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1129–1135.
doi: 10.15789/2220-7619-АНС-1929

Исследование финансировалось за счет гранта Тюменского государственного медицинского университета
в области биомедицинских и биофармацевтических технологий от 12 августа 2021 г. № 8210053.

The study was funded by a grant from the Tyumen State Medical University
in the field of biomedical and biopharmaceutical technologies (August 12, 2021, No. 8210053).

физиологии *Candida* sp., так как дает возможность прогнозировать динамику состояния микроорганизма и учитывать особенности срочной и долговременной адаптации к разным факторам внешней среды. Выявление суточных ритмов биопленкообразующей активности у различных штаммов *Candida* sp. открывает возможность управлять жизнеспособностью бактериально-грибковых ассоциаций и прогнозировать их устойчивость к различным антимикробным средствам.

Ключевые слова: биопленка, макрометрический метод, грибы рода *Candida*, кандидозный дисбиоз, ритмометрические параметры.

A 24-HOUR *CANDIDA* sp. BIOFILM FORMATION DYNAMICALLY ASSESSED WITH MODIFIED MACROMETRIC METHOD

Nikolenko M.V., Baryshnikova N.V., Malishevskaya O.I., Enoktaeva O.V., Vaseva E.M.

Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to study the dynamics of 24-hour *Candida* spp. biofilm formation by using a modified macrometric method. The proposed macrometric method solves the problem of accelerating and simplifying the quantitative assessment of the biofilm formation process, increases sensitivity due to allowing to avoid mistakes related to applied polystyrene material. The ease of implementing such a technique makes it accessible to any laboratory. Reference strains from the American Type Culture Collection (ATCC) and clinical isolates of *Candida* spp. isolated from the female reproductive tract with candida dysbiosis were used for the study. Biofilm formation of *Candida* spp. studied according to the O'Toole G.A. et al. method modified by us. The biological activity of *Candida* sp. biofilm formation was monitored for 48 hours with 4-hour intervals, in winter season, the IV phase of the moon. A 48-hour fungal culture corresponding to relevant maximum adhesion on glass surface was used. The study chrono-design implied obtaining 6 diurnal measurements for the function evaluated with a 3–5-repeats of the experimental conditions. Amplitude-phase characteristics of the studied biorhythms were graphically represented using cosinor analysis serving as the basic method to identify and model cyclic processes in biological systems. The study proved that the ability of micromycete cells to adhere is significantly higher in the stationary vs. logarithmic growth phase ($p < 0.05$). The chronobiological technique used here allowed to reveal the presence of diurnal fungal film-forming activity ($p < 0.05$) and reveal the general patterns of manifested properties in representatives of all candida species examined. It has been experimentally established that the sequence and consistency of the biological properties of clinical *Candida* sp. isolates over time were not fundamentally dependent on the type of fungus. During the study, rhythmometric markers of the strain-related pathogenicity was established reflecting contribution of rhythm and the amplitude-phase characteristic. It has been proven that the activity of biofilm formation increases along the “reference strains — clinical isolates” axis. For *C. albicans* the Mann–Whitney test data was 29, for *C. tropicalis* — 26, and for *C. krusei* — 30 ($p < 0.05$). We believe that chronobiological method opens up new perspectives in the studying physiology of *Candida* spp. because it allows to dynamically predict state of microorganism and take into account features of urgent and long-term adaptation to various environmental factors. Identifying diurnal rhythms in biofilm-forming activity of various *Candida* sp. strains opens up an opportunity to control viability of bacterial-fungal associations and predict related resistance to diverse antimicrobial agents.

Key words: biofilm, macrometric method, fungi of *Candida* genus, candida dysbiosis, rhythmometric parameters.

Введение

Формирование биопленочных сообществ является одной из основных стратегий выживания бактерий и грибов в той экологической нише, которую они занимают. В биопленках бактериально-грибковые микросимбиозы приобретают защиту от различных физических (УФ излучение, высушивание), химических (изменение pH, антибиотики, биоциды, поверхностно-активные вещества), биологических антимикробных факторов (фагоциты, антитела, бактериофаги, факторы естественной резистентности макроорганизма), что позволяет рассматривать биопленку как одну из форм персистенции микроорганизмов [2]. Имеются сведения, что с образованием биопленок связа-

ны до 80% инфекционных заболеваний и множественная антибиотикорезистентность микроорганизмов [17, 18]. В ряде обзорных работ отражено значение биопленок для различных областей науки и практики, демонстрирующее возросший интерес к этой проблеме и информация о большом количестве методов изучения, культивирования и индикации биопленок *in vitro* и *in vivo* [1, 7, 22, 23, 24].

Широко используются в последние десятилетия динамические методики исследования биопленкообразования с использованием лабораторных ферментеров, аппарата Робинсона в его различных модификациях, проточный метод [12, 19]. Основным преимуществом динамических методов формирования биопленок является максимальное приближение к условиям

живых систем [14]. Инновационные технические решения — использование флуоресцентной, конфокальной сканирующей лазерной и электронной микроскопии. Данные методы позволили выявить гетерогенную структуру бактериально-грибковых биопленок. Изучены гены, кодирующие белки адгезии *Candida* sp. и описаны фазы формирования биопленки: прилипания, образование межклеточного матрикса и формирования зрелой биопленки, состоящей из единичных клеток и мицелия [21, 22, 27]. В своих работах М. Al-Fattani и соавт. изучили химический состав матрицы биопленок *Candida albicans* (*C. albicans*) и *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) [19]. Основными структурными компонентами были белки, углеводы, гексозамин и фосфор.

В последнее время изучение биопленок в бактериально-грибковых популяциях проводят методом флуоресцентной гибридизации *in situ*, который позволяет определить расположение мРНК в клетках, образующих биопленки. С помощью этого метода выявлены клетки-персистеры, ответственные за выживание популяции при воздействии факторов различной природы [11].

Изучение биопленок *in vitro* имеет целый ряд ограничений. D. Andes и соавт. изучали образование и структуру биопленок в центральной вене крыс с помощью флуоресцентной и электронной микроскопии [20]. Экспериментально доказано, что в пространстве, смежном с поверхностью катетера, клетки *Candida* sp. плотно прилегали к внеклеточному матриксу. Слой, смежный с катетером, был менее плотен. Наиболее удаленная поверхность биопленки содержала единичные клетки *Candida* sp., которые были вложены в волокнистый внеклеточный материал. Подобные особенности структуры биопленки *Candida* sp. характерны и для моделей *in vitro*. Однако электронная микроскопия показала наличие клеток экспериментального животного в составе матрицы биопленки [28].

В этой связи, предлагаемые методы выявления биопленкообразования сложны, требуют специализированного оборудования, вивария, что создает в реальной клинической практике сложности в выявлении биопленок и создается ложное представление о низкой частоте данного биологического образования.

Вторая группа методов основана на создании статических условий культивирования микроорганизмов, которые удобны, высоко производительны и наглядны. Однако научный интерес отечественных исследователей к нему в последнее время значительно снизился, а практическое значение так и не получило должной оценки. Авторами предложен вариант модификации популярной методологии биопленко-

образования на пластиковой посуде в течение суток. Биоритмы обеспечивают необходимую последовательность физиологических, метаболических и биохимических процессов и оптимальное соотношение ее параметров в каждый момент времени [13]. С этой точки зрения хронобиологический подход выступает одновременно и как методологический принцип, и как методический прием [4, 15].

Цель исследования — изучить динамику биопленкообразования *Candida* sp. в течение суток модифицированным макрометрическим методом.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 17 изолятов *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. krusei*, выделенные из женского репродуктивного тракта при кандидозном дисбиозе. Контроль — депонированные эталонные штаммы *Candida* sp., полученные из американской коллекции типовых культур (ATCC) *C. albicans* 24433, *C. tropicalis* 750, *C. krusei* 6258. Данные виды грибов выбраны в качестве модели, так как в подавляющем большинстве случаев (85–90%) возбудителем кандидоза является *C. albicans*, наиболее патогенный и значимый в клинической практике вид. Среди остальных видов *Candida* sp. клиническое значение имеют преимущественно *C. tropicalis* — 3–5%, *C. krusei* — 1–3%. В последнее время увеличивается количество заболеваний, вызванных именно грибами *C. non-albicans* [9].

Выделение и идентификацию грибов проводили по комплексу признаков: внешний вид колоний, хламидоспорообразование, тест на образование ростовых трубок, чувствительность к антифунгальным препаратам дискодиффузионным методом, ассимиляционная способность [6].

В работе представлена модификация способа оценки биопленкообразования, предложенного O'Toole G.A. и соавт. [27]. На первом этапе исследования были получены 24-часовые культуры, выращенные на питательной среде Сабуро с теллуридом (НПО «Питательные среды», Россия) при температуре 37°C, что соответствовало началу стационарной фазы развития грибов. Биопленки получали в стеклянных стандартных по ГОСТу пробирках (14 мл), промытых хромовой смесью. Исходную концентрацию микроорганизмов 0,5 McFarland готовили с помощью прибора для определения мутности микробной суспензии — Densi-Lameter (Lachema, Чехия). Рабочую концентрацию $1,5 \times 10^3$ КОЕ/мл получали титрованием культуры в физиологическом растворе, затем добавляли в пробирки с бульоном Сабуро (НПО «Питательные среды», Россия) и инкубировали

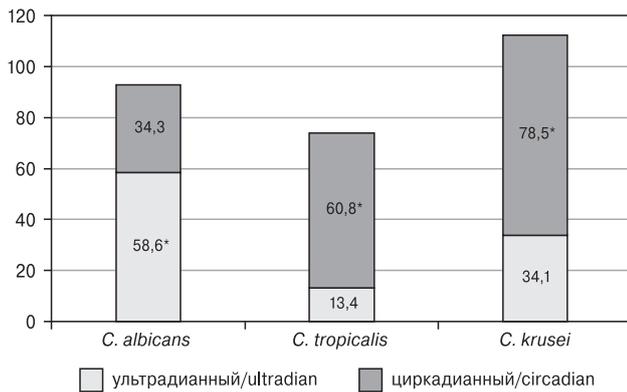


Рисунок 1. Вклад ритмов биопленкообразования музейных штаммов *Candida* sp.

Figure 1. Contribution of biofilm formation rhythms of archival *Candida* sp. strains

Примечание. * $p < 0,05$

Note. * $p < 0,05$

в термостате при температуре 37°C. Для удаления планктонной фазы популяции производили забор содержимого из пробирок пипеткой, не задевая стенок сосуда и дважды аккуратно промывали дистиллированной водой. Для количественной оценки способности дрожжевых грибов к пленкообразованию добавляли 2 мл генцианового фиолетового в пробирку. Спустя 45 мин сливали краситель, стенки пробирки многократно промывали дистиллированной водой. Для десорбции красителя в органический растворитель в каждую пробирку на 15 мин добавляли 2 мл 96% этилового спирта.

Кинетику образования биопленки изучали по изменению коэффициента пропускания света и оптической плотности на спектрофотометре КФК-3-01 при длине волны 540 нм, измерения проводили через 24, 36, 48, 72 и 96 ч. В качестве контроля применяли 96% этиловый спирт. Экстрагированный этанолом из биопленки генциановый фиолетовый помещали в одноразовые пластиковые кюветы «макро» размером 10 × 10 × 45 мм, объемом 4 мл (длина оптического пути 10 мм). Температура измеряемых жидкостей соответствовала комнатной температуре. Для получения статистически достоверных данных эксперимент повторяли 5 раз.

Статистическую обработку материалов и графическое изображение результатов осуществляли с использованием программ: Primer of Biostatistics Version 4.03 by Stanton A. Glantz 1998, Microsoft Office Excel 2010. Определяли M — среднее арифметическое, δ — среднее квадратичное отклонение, m — средняя ошибка среднего арифметического, данные представляли по форме $M \pm m$ или $M \pm \delta$. В случае соответствия сравниваемых выборок нормальному закону распределения (по χ^2) использовали t -критерий Стьюдента.

На втором этапе изучали биологическую активность пленкообразования *Candida* sp. в течение двух суток с 4-часовым интервалом, в зимнее время года, IV фаза Луны. Использовали 48-часовую культуру грибов, что соответствовало максимальной адгезии их на поверхности стекла. Хронодизайн исследований подразумевал получение по оцениваемой функции 6-ти измерений в сутки с 3–5-ти кратным повторением условий эксперимента. Проведено 11 экспериментов, получено 486 измерений.

Данные были обработаны по методу наименьших квадратов (косинор-анализ) при заданной значимости достоверности, $p < 0,05$ [26]. Для каждого штамма впоследствии определены основные параметры ритмов с периодами $T = 12$ и $T = 24$ часа: мезор (M) — среднее значение гармонической кривой наилучшей аппроксимации функции (косинусоиды), амплитуда ритма (A) — расстояние от экстремума до мезора и акрофаза (ϕ) — момент времени ожидаемого экстремума функции.

Непараметрическим методом статистической обработки — критерием Манна–Уитни (T) — сравнивали различия между несвязанными выборками (опыт — контроль, музейные и госпитальные культуры). Анализируемые различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Все изоляты *Candida* sp. обладали характерной скоростью роста. Адгезивные свойства грибов рода *Candida* зависели от фазы их развития. Стеклоянная поверхность пробирки в питательной среде покрывалась первичной пленкой через 12 ч культивирования. При визуальном осмотре биопленки, уже через 24 ч культивирования, покрывали всю поверхность стекла, контаминированного с питательной средой.

Экспериментально выявлено, что наиболее оптимальным временем для исследования биопленкообразования является временная точка 48 часов. В этот период коэффициент пропускания света являлся самым высоким, так как клеточные стенки грибов внутри биопленки максимально сорбировали генциановый фиолетовый. Следовательно, способность клеток микромицетов к адгезии достоверно выше в стационарной фазе роста, чем логарифмической. Период культивирования 72–96 ч характеризовался снижением биопленкообразования грибов, так как их клетки теряли подвижность и начинали интенсивно выделять внеклеточные полимеры, образуя полимерный матрикс [13]. Подобные результаты были получены С.А. Лисовской (2008) при наблюдении 1–4-суточных культур с использованием методики выращивания биопленок на нитроцеллюлозной поверхности [10].

Используемый нами хронобиологический прием позволил выявить наличие пленкообразующей активности грибов в течение суток ($p < 0,05$) и обнаружить общие закономерности проявления свойств у представителей всех изучаемых видов.

Суточная динамика биопленкообразования *C. albicans* характеризовалась ультрадианным (около 12-часовым) вкладом ритма в утреннее (04:00) и вечернее (16:00) время. У *C. non-albicans* выявлены достоверные циркадианные (около-суточные) ритмы активности адгезии к поверхности стекла. Максимальные значения показателя регистрировались у *C. tropicalis* в вечернее время — 17:00–17:23, а у *C. krusei* в ночные часы — 20:00–23:20. Вклад ритмов формирования биопленок музейными культурами представлен на рис. 1.

Наличие циркадианных ритмов в спектральном составе микроорганизмов одновременно с ультрадианными гармониками указывало на усиление адаптивных возможностей микроорганизмов. Среднесуточные показатели биопленкообразования не превышали $1,4 \pm 0,05$, что позволило судить о низкой активности всех изучаемых культур. Аналогичные результаты получены при изучении суточной динамики адгезивных свойств музейных штаммов *Candida* sp., адсорбированных на формализованных эритроцитах человека 0 (I) группы Rh(+) [16].

У клинических изолятов грибов, выделенных из женского репродуктивного тракта при кандидозном дисбиозе, динамика биопленкообразования характеризовалась достоверными ультрадианными гармониками (рис. 2). Максимальные значения фиксировались в ранние утренние часы — 03:09–04:18 и в вечернее время с 18:45 до 20:20.

Ультрадианные ритмы характеризуют, напротив, вариабельность периодов, что имеет важное биологическое значение, определяющее устойчивость к внешним воздействиям и способность к адаптивному ответу на периодические раздражители [8]. Мезор пленкообразующей активности у всех изучаемых клинических изолятов составил $2,6 \pm 0,01$ ($p < 0,05$). Амплитуда колебаний показателя выросла в 4,6 раз по сравнению с музейными штаммами. Представленные результаты модифицированным макрометрическим методом согласуются с данными, полученными авторами при изучении адгезии микроорганизмов экспресс-методом и развернутым методом В.И. Брилиса и соавт., 1986 г. [16]. Предложенной методикой доказано, что последовательность и согласованность формирования пленок клиническими изолятами *Candida* sp. во времени принципиально не зависят от вида гриба и, возможно, данный механизм адаптации закономерен и яв-

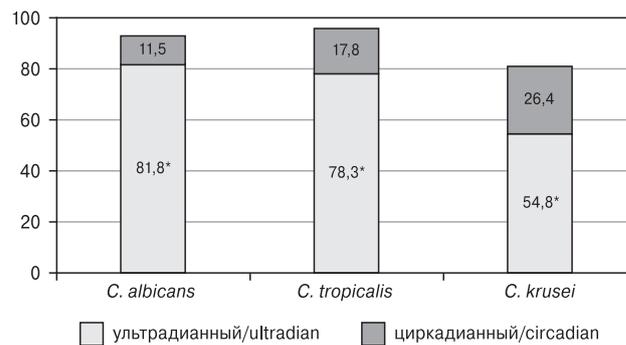


Рисунок 2. Вклад ритмов биопленкообразования клинических изолятов *Candida* sp.

Figure 2. Contribution of biofilm formation rhythms for *Candida* sp. clinical isolates

Примечание. * $p < 0,05$.

Note. * $p < 0.05$.

ляется характерным признаком биологической активности дрожжевых патогенов.

Подход к инфекции с позиции хронобиологии расширяет представления о физиологии грибов. В ходе исследования установлены ритмометрические маркеры патогенности штамма — это вклад ритма и амплитудно-фазовая характеристика изучаемого свойства, которое не является стационарным — и дают возможность отличать патологические нарушения от приспособительных изменений [3, 4, 25].

Анализ хронопоказателей активности пленкообразования клинических изолятов и эталонных штаммов *Candida* sp. показал, что у грибов, выделенных из организма человека, изменялся вклад ритма, мезор и амплитуда колебаний функции повышались в направлении «эталонные штаммы → клинические изоляты». Критерий Манна–Уитни у *C. albicans* составил 29, *C. tropicalis* — 26, *C. krusei* — 30 ($p < 0,05$).

Выявленная закономерность согласуется с данными биопленкообразования, полученными на силиконовых моделях. Доказано методами конфокальной сканирующей лазерной и электронной микроскопии, что биопленки *C. albicans* состояли из слоев бластоспор с плотно лежащей матрицей из полисахаридов. Биопленки *C. non-albicans* имели меньший объем, чем пленки *C. albicans*, и содержали только бластоспоры, собранные в одну группу. Полученные результаты свидетельствовали, что *C. albicans* формирует количественно большую и структурно более сложную биопленку, чем грибы *Candida non-albicans* [28]. У *C. albicans* межклеточный матрикс состоял на 57% из глюкозы, а в биопленке *C. tropicalis* преобладал гексозамин. Пленочные биологические образования у *C. albicans* легче отделялись от пластмассовых поверхностей с помощью обработки ферментом бета-1,3-глюканаза, чем *C. tropicalis* [5].

Заключение

Существование биопленок при хронических инфекциях требует совершенно новых подходов к их диагностике. Предложенный макрометрический метод решает задачи по ускорению и упрощению количественной оценки процесса биопленкообразования, увеличивает чувствительность, так как позволяет исключить ошибки, связанные с использованием полистеролового материала. Простота выполнения приведенной методики делает ее доступной для любой лаборатории.

Использование хронобиологического метода, на наш взгляд, открывает новые перспективы при изучении физиологии *Candida* sp., так как дает возможность прогнозировать ди-

намику состояния микроорганизма и учитывать особенности срочной и долговременной адаптации к разным факторам внешней среды. Выявление суточных ритмов биопленкообразующей активности у различных штаммов *Candida* sp., открывает возможность управлять жизнеспособностью бактериально-грибковых ассоциаций и прогнозировать их устойчивость к различным антимикробным средствам.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность Тюменскому государственному медицинскому университету за поддержку в проведении исследования.

Список литературы/References

1. Ашофф Ю. Биологические ритмы; пер. с англ. М.: Мир, 1984. Т. 1. 262 с. [Aschoff J. Biological rhythms; trans. from English. Moscow: Mir, 1984. Vol. 1. 262 p. (In Russ.)]
2. Бухарин О.В. Симбиотические взаимоотношения микроорганизмов при инфекции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. № 1. С. 93–97. [Bukharin O.V. Symbiotic relationships of microorganisms during infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 1, pp. 93–97. (In Russ.)]
3. Губин Г.Д., Дуров А.М., Губин Д.Г. Биоритмы, второй закон термодинамики, биологический возраст // Циклы природы и общества. 1994. Т. 4. С. 15–19. [Gubin G.D., Durov A.M., Gubin D.G., Biorhythms, the second law of thermodynamics, biological age. *Tsikly prirody i obshchestva = Cycles of Nature and Society*, 1994, vol. 4, pp. 15–19. (In Russ.)]
4. Губин Д.Г., Губин Г.Д. Хроном сердечно-сосудистой системы на различных этапах онтогенеза человека. Тюмень: ВекторБук, 2000. 176 с. [Gubin D.G., Gubin G.D. Chronom of cardiovascular system at different stages of ontogenesis in men. *Tyumen: Vector Book*, 2000. 176 p. (In Russ.)]
5. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А., Чилина Г.А. *Candida*. Кандидозы. Лабораторная диагностика. Под ред. проф. Н.П. Елинова. СПб.: Коста, 2010. 224 с. [Yelinov N.P., Vasilyeva N.V., Stepanova A.A., Chilina G.A. *Candida*. Candidiasis. Laboratory diagnostics; ed. N.P. Elinov. St. Petersburg: Costa, 2010. 224 p. (In Russ.)]
6. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. 2004. Т. 40, № 11. С. 1445–1456. [Irina T.S., Romanova Yu.M., Gintsburg A.L. Biofilms as a mode of existence of bacteria in external environment and host body: the phenomenon, genetic control, and regulation systems of development. *Genetika = Russian Journal of Genetics*, 2004, vol. 40, no. 11, pp. 1445–1456. (In Russ.)]
7. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. Хронобиология и хрономедицина. М.: Триада-Х, 2000. 488 с. [Komarov F.I., Rapoport S.I. Chronobiology and chronomedicine. Moscow: Triada-X, 2000. 488 p. (In Russ.)]
8. Леуш С.С., Рощина Г.Ф., Полтавцева О.Ф. Особенности клинического течения и лечения различных форм урогенитального кандидоза // Украинський журнал дерматології, венерології, косметології. 2003. № 2 (9). С. 72–75. [Leush S.S., Roshchina G.F., Poltavtseva O.F. Clinical course and treatment of various forms of urogenital candidiasis. *Ukrainian Journal of Dermatology, Venereology, Cosmetology*, 2003, no. 2 (9), pp. 72–75. (In Russ.)]
9. Лисовская А.М. Изучение биологических свойств *Candida* spp, выделенных из различных локусов у лабораторных больных // Проблемы медицинской микологии. 2006. Т.8, № 2. С. 34. [Lisovskaya A.M. A study of the biological properties of candida spp. Isolated from different loci of outpatients. *Problemy meditsinskoi mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2006, vol. 8, no. 2, p. 34. (In Russ.)]
10. Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В. Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективы // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. Т. 14, № 1. С. 17–22. [Lyamin A.V., Botkin E.A., Zhestkov A.V. Methods of biofilm evaluation: opportunities and perspectives. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, vol. 14, no. 1, pp. 17–22. (In Russ.)]
11. Марданова А.М., Кабанов Д.А., Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р. Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие. Казань: К(П)ФУ, 2016. 42 с. [Mardanova A.M., Kabanov D.A., Rudakova N.L., Sharipova M.R. Biofilms: basic research methods: teaching aid. Kazan: K(P)FU, 2016. 42 p. (In Russ.)]
12. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. 2007. Т. 76, № 2. С. 149–163. [Nikolaev Yu.A., Plakunov V.K. Biofilm — “city of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Mikrobiologiya = Microbiology*, 2007, vol. 76, no. 2, pp. 149–163. (In Russ.)]
13. Окулич В.К., Кабанова А.А., Плотников Ф.В. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск: ВГМУ, 2017. 300 с. [Okulich V.K., Kabanova A.A., Plotnikov F.V. Microbial biofilms in clinical microbiology and antibiotic therapy. Vitebsk: VSMU, 2017. 300 p. (In Russ.)]

14. Романов Ю.А. Пространственно-временная организация биологических систем // Вестник Российской академии медицинских наук. 2002. № 6. С. 13–18. [Romanov Yu.A. Theory of space-time organization of biological systems. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2002, no. 6, pp. 13–18. (In Russ.)]
15. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам// Успехи биологической химии. 2004. Т. 44. С. 263–306. [Sidorenko S.V., Tishkov V.I. Molecular basis of antibiotic resistance. *Uspekhi biologicheskoi khimii = Biochemistry (Moscow)*, 2004, vol. 44, pp. 263–306. (In Russ.)]
16. Тимохина Т.Х., Николенко М.В., Варницына В.В., Перунова Н.Б., Бухарин О.В. Временная организация биологических свойств *Candida albicans* // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2011. № 2 (30). С. 226–228. [Timokhina T.H., Nikolenko M.V., Varnitsyna V.V., Perunova N.B., Bukharin O.V. Temporary organization of biological properties of *Candida albicans*. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Izvestia Orenburg State Agrarian University*, 2011, no. 2 (30), pp. 226–228. (In Russ.)]
17. Чеботарь И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета // Вестник Российской академии медицинских наук. 2012. № 12. С. 22–28. [Chebotar I.V. Mechanisms of antibiofilm immunity. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, no. 12, pp. 22–28. (In Russ.)]
18. Чеботарь И.В., Погорелов А.Г., Яшин В.А., Гурьев Е.Л. Современные технологии исследования бактериальных биопленок // Современные технологии в медицине. 2013. Т. 5, № 1. С. 14–20. [Chebotar I.V., Pogorelov A.G., Yashin V.A., Guryev E.L. Modern technologies of bacterial biofilm study. *Sovremennye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2013, vol. 5, no. 1, pp. 14–20. (In Russ.)]
19. Al-Fattani M., Douglas L. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, vol. 48, no. 9, pp. 3291–3297. doi: 10.1128/AAC.48.9.3291-3297.2004
20. Andes D., Nett J., Oschel P., Albrecht R., Marchillo K., Pitula A. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 10, pp. 6023–6031. doi: 10.1128/IAI.72.10.6023-6031.2004
21. Bachmann S.P., VandeWalle K., Ramage G., Patterson T.F., Wickes B.L., Graybill J.R., López-Ribot J.L. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, vol. 46, no. 11, pp. 3591–3596. doi: 10.1128/AAC.46.11.3591-3596.2002
22. Chandra J., Mukherjee P.K., Leidich S.D., Faddoul F.F., Hoyer L.L., Douglas L.J., Ghannoum M.A. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J. Dent. Res.*, 2001, vol. 80, no. 3, pp. 903–908. doi: 10.1177/00220345010800031101
23. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, vol. 284, pp. 1318–1322. doi: 10.1126/science.284.5418.1318
24. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, vol. 15, pp. 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
25. Halberg F., Cornelissen G. Consensus concerning the chromom and the addition to statistical significance of scientific significance. *Biochim. Clin.*, 1991, vol. 15, pp. 159–162.
26. Nelson W., Tong Y.L., Lee J.K. Methods for cosinorhythmometry. *Chronobiologia*, 1979, vol. 6, no. 4, pp. 305–323.
27. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000, no. 54, pp. 49–79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
28. Ramage G., Vande Walle K., Wickes B.L., López-Ribot J.L. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, vol. 45, no. 9, pp. 2475–2479. doi: 10.1128/AAC.45.9.2475-2479.2001

Авторы:

Николенко М.В., д.б.н., доцент, профессор кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия;

Барышников Н.В., ассистент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия;

Малишевская О.И., к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтических дисциплин ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия;

Еноктаева О.В., ассистент кафедры биологии ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия;

Васева Е.М., к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтических дисциплин ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия.

Authors:

Nikolenko M.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Professor of the Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Baryshnikova N.V., Assistant Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Malishevskaya O.I., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Disciplines, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Enoktaeva O.V., Assistant Professor, Department of Biology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Vaseva E.M., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Disciplines, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation.

Поступила в редакцию 18.04.2022
Отправлена на доработку 02.06.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 18.04.2022
Revision received 02.06.2022
Accepted 28.07.2022

A CORRELATION BETWEEN Lp-PLA2 AND MONOCYTE LEVELS IN ATHEROSCLEROSIS RISK SUBJECTS

K. Kumboyono, I.N. Chomsy, D. Vijayadas, T.A. Wihastuti

University of Brawijaya, Malang, Indonesia

Abstract. *Background.* Cardiovascular disease (CVD) is the most significant cause of death worldwide. More than 17.9 million people died from CVD, of which 85% deceased due to heart disease. On the other hand, atherosclerosis is one of the most dominant CVD in most developing countries and developed countries. Lp-PLA2 is an enzyme produced by inflammatory cells and a pro-atherogenic protein in atherosclerosis. In the process, monocytes will produce Lp-PLA2 so that it may hydrolyse oxidized low density lipoprotein (oxLDL) into lysophosphatidylcholine (lysoPC) and oxidized fatty acids (oxFA), atherogenic proteins involved in atherogenesis. A chronic inflammatory process that occurs in atherosclerosis requires early detection to avoid CVD severity. The research aims to determine the correlation between Lp-PLA2 concentration and monocyte count as well as percentage in cohorts linked to risk of atherosclerosis. *Materials and methods.* This study was a descriptive correlational analysis of the population with conditions at risk of atherosclerosis. The total number of respondents sampled in this research was 86. We used the ELISA method to measure Lp-PLA2 concentration and the Hematology Analyzer method to measure monocyte count and percentage. *Results.* The relationship between monocyte and Lp-PLA2 level accounts for a probability value of 0.028. The correlation coefficient of 0.789 is categorized as very strong. *Conclusion.* Increase in the concentration of Lp-PLA2 correlates with monocyte count and percentage in a population with conditions at risk of atherosclerosis.

Key words: atherosclerosis, enzyme, Lp-PLA2, inflammatory cells, monocytes population, pro-atherogenic marker.

КОРРЕЛЯЦИЯ УРОВНЕЙ Lp-PLA2 И МОНОЦИТОВ У ЛЮДЕЙ С РИСКОМ АТЕРОСКЛЕРОЗА

Кумбойоно К., Чомси И.Н., Виджаядас Д., Вихастути Т.А.

Университет Бравиджая, г. Маланг, Индонезия

Резюме. *Актуальность.* Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются наиболее серьезной причиной смертности во всем мире. От сердечно-сосудистых заболеваний умерло более 17,9 млн человек, из них 85% — от болезней сердца. С другой стороны, атеросклероз является одним из наиболее распространенных ССЗ в большинстве развивающихся и развитых стран. Lp-PLA2 является ферментом, синтезируемым воспалительными клетками, и проатерогенным белком при атеросклерозе. При этом моноциты продуцируют Lp-PLA2 для гидролиза окисленного липопротеина низкой плотности (oxLDL) в лизофосфатидилхолин (lysoPC) и окисленные жирные кислоты (oxFA), атерогенные белки, участвующие в атерогенезе. Хронический воспалительный процесс, возникающий при атеросклерозе, требует раннего выявления во избежание утяжеления ССЗ. Исследование направлено на определение корреляции между концентрацией Lp-PLA2 и количеством моно-

Адрес для переписки:

Титин Андри Вихастути
65145, Индонезия, Университет Бравиджая,
Факультет медицинских наук.
E-mail: titinwihastuti@gmail.com

Contacts:

Titin Andri Wihastuti
65145, Indonesia, University of Brawijaya,
Faculty of Health Sciences.
E-mail: titinwihastuti@gmail.com

Для цитирования:

Кумбойоно К., Чомси И.Н., Виджаядас Д., Вихастути Т.А. Корреляция уровней Lp-PLA2 и моноцитов у людей с риском атеросклероза // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1136–1142. doi: 10.15789/2220-7619-CBL-1864

Citation:

Kumboyono K., Chomsy I.N., Vijayadas D., Wihastuti T.A. A correlation between Lp-PLA2 and monocyte levels in atherosclerosis risk subjects // Russian Journal of Infection and Immunity = Infeksiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1136–1142. doi: 10.15789/2220-7619-CBL-1864

цитов, а также процентом в группах лиц, связанных с риском атеросклероза. *Материалы и методы.* Настоящее исследование представляло собой описательный корреляционный анализ населения с состояниями, подверженными риску атеросклероза. Общее количество лиц, отобранных в этом исследовании, составило 86. Мы использовали метод ELISA для измерения концентрации Lp-PLA2 и метод гематологического анализатора для измерения количества и процентного содержания моноцитов. *Результаты.* Взаимосвязь между уровнем моноцитов и Lp-PLA2 составляет значение вероятности 0,028. Коэффициент корреляции 0,789 относится к категории очень сильных. *Заключение.* Увеличение концентрации Lp-PLA2 коррелирует с количеством и процентом моноцитов в популяции с состояниями риска атеросклероза.

Ключевые слова: атеросклероз, фермент, Lp-PLA2, клетки воспаления, популяция моноцитов, проатерогенный маркер.

Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is the most significant cause of death worldwide. More than 17.9 million people died from CVD, 31% of all deaths in the world, of which 85% globally were due to heart disease [33]. On the other hand, atherosclerosis is one of the most dominant CVD in most developing countries and developed countries. Therefore, a high mortality rate has been registered with this disease. Most Asian countries experience challenges from cardiovascular disease, with mortality rates varying from 103 to 366 per year in adults reported by newly published studies. Elevated cholesterol levels in the population have become a frequent cause. Older men and people with dyslipidemia, hypertension, and diabetes are at high risk of cardiovascular disease. Over the past decade, there has been a tendency to escalate atherosclerotic changes, especially in East Asia, with an increase of 117.2% and 115.3% of total deaths and disability-adjusted by 2015 [7].

Many CVD risk factors (smoking, dyslipidemia, hypertension) are known to lead to atherosclerosis. It begins with dysfunction of endothelial function. Endothelial function plays a central role in vasomotor abnormalities and inflammatory responses [8]. Dysfunction of these tissues happens due to inflammatory response followed by plaque formation. Plaque consists of cholesterol, fatty acid, calcium, and fibrin, leading to blockage at the artery wall. Blockage of the artery wall by the plaque will reduce the flow of blood and oxygen supply [16]. The abrupt change mechanism is associated with acute thrombosis in atherosclerotic plaque that is eroded, cracked or ruptured. The rupture of atherosclerotic plaque is associated with unstable atherosclerotic plaque changes that are volatile and easily torn. Therefore, laboratory tests are also intended to detect early plaque phase changes before arterial plaque rupture [1, 14].

Arterial plaque rupture will cause a lesion that will attract circulating monocytes to the lesion area [17]. The interaction between leukocytes, platelets, and blood vessel cells leads to monocyte production in the bone marrow, releasing it into an artery and attaching it to the endothelial cell. Continuous recruitment of monocytes to the lesion will cause the accumulation of macrophages. Macrophages will ingest oxidised lipoprotein into developing plaques through

scavenger receptors [29]. In this process, macrophages cause the expansion of the necrotic nucleus of atherosclerotic plaque, fibrous capsule depletion, and destabilisation of plaque resulting in rupture of arterial plaque, which will initiate atherosclerosis [9].

Many endogenous factors affect the occurrence of atherosclerosis, both protective factors and aggravating factors. Monocytes are a type of protective cell, but they also play a role in induction of atherosclerosis. Monocytes are white blood cells related to granulocytes, which are white blood cells designed to kill bacteria. Monocytes are produced in the bone marrow and then released into the bloodstream. Young monocyte cells start as monoblasts in the bone marrow. Once released, they leave the bone marrow and circulate through the bloodstream for a few hours before getting to other tissues, such as the spleen and lungs. Once monocytes are embedded in tissues, they become macrophages. Macrophages support healthy immune function by destroying and ingesting pathogens. They also help lymphocyte cells recognise pathogens and create antibodies against them [12, 13]. Rupture at the blood vessel will cause a lesion, attracting the circulating monocytes to the lesion area. The interaction between leukocytes, platelets, and blood vessel cells leads to monocyte production in the bone marrow and release to circulating blood. Continuous recruitment of monocyte to the lesion will cause the accumulation of macrophages. Macrophages ingest oxidised lipoproteins through scavenger receptors and lipid-rich cells, contributing to the physical aspect of plaque development [21].

In this process, macrophages, lymphocytes and mast cells produce an enzyme known as Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) [32]. Lp-PLA2 hydrolyses oxidised LDL (oxLDL) to produce lysophosphatidylcholine (lysoPC) and oxidised fatty acids (oxFA). LysoPC and oxFA will cause endothelial dysfunction, inducing apoptosis of smooth muscle cells and macrophages that cause the expansion of the necrotic nucleus of atherosclerotic plaque, fibrous capsule depletion, and destabilisation of plaque resulting in rupture of arterial plaque. Therefore, the localisation of Lp-PLA2 in atherosclerotic lesions and their association with plaque instability supports a potential causal role for Lp-PLA2 in cardiovascular disease (CVD) [28].

A chronic inflammatory process occurs at different stages of atherosclerosis [9], and the stages of atherosclerosis development are essential stages that require early detection to avoid CVD severity. Research shows that increased levels of Lp-PLA2 are linearly correlated with increased risk of CVD. However, it is known that Lp-PLA2 can be pro-inflammatory and anti-inflammatory at certain stages in the mechanism of CVD pathology. This research seeks to prove the anti-inflammatory role of Lp-PLA2. Therefore, the researchers sought to analyse the correlation between the monocyte population and Lp-PLA2 levels as two variables that can be used as markers for the early stages of atherogenesis, hopefully in time to prevent severe disease.

Materials and methods

Research design. This research was a cross-sectional study. The sample population of this research was chosen by total sampling among 86 people who attended health examination with risk factors of atherosclerosis based on American College of Cardiology (ACC) and American Heart Association (AHA) guidelines in Malang, East Java, Indonesia. We used human venous blood sampling to determine the concentration of Lp-PLA2 and circulating monocytes. Examination of blood profiles was conducted at the Saiful Anwar Central Hospital Laboratory, Malang. Measurement of Lp-PLA2 and monocyte concentrations was conducted in the Bioscience Laboratory, University Brawijaya, Malang.

Measurement of Lp-PLA2. Blood obtained from respondents was placed in an EDTA vacutainer containing anticoagulant and incubated for 10–20 minutes. Blood in the EDTA vacutainer was then centrifuged for 20 minutes at 2000–3000 rpm. Blood was then diluted with standard buffer solution. On the tube samples, 40 μ L sample buffer solution was entered into the plate with 10 μ L sample buffer solution consistent with dilution factor; they were then well shaken. The sample was then incubated for 30 minutes at 37°C. The concentrated buffer was diluted with water, and then 50 μ L HRP-conjugated reagent was added to each tube, except for the control tube. The solution was incubated for 10 minutes and washed back. Fifty microliters of chromogen A and B solution were added into both tubes, shaken well, and incubated at 37°C for 15 minutes. Fifty microliters stop anti-dilution provisions were added into each tube to stop the reaction. The colour of the sample in the tube changed from blue to yellow. The optical absorption of the samples was read at 450 nm using a microtiter plate reader.

Measurement of monocytes. Monocytes were measured using the Hematology Analyzer method. The capillary tube is filled with blood. The speci-

men flows down the tube until it is near the dry end. The dry end was inserted vertically into the sealant and pushed to the tray's bottom. The tube is twisted to remove it from the sealant and to prevent the sealing plug from being extracted. The sealed end of the tube was tapped on a flat surface to help ensure proper sealant contact in the tube. The prepared capillary tube was then wiped off. The capillary tube was put carefully in the centrifuge tube holder with the sealant end down. All tube positions were numbered on the rotor and can be used to record the position of each patient specimen. With the tube holders and hematocrit tubes in place, the lid was locked by firmly pressing down. Measurement of monocyte cells was based on the optical double-angle light scattering method (2...5°C).

Ethics clearance. The Medical Research Ethics Committee, Medical Faculty of the University of Brawijaya approved the research (Letter Number 277/EC/KEPK-S1-PD/11/2018).

Data analysis. Data analysis used the SPSS v.17 application with a confidence level of 95% ($p < 0.05$). Normality was tested with the Kolmogorov-Smirnov method, followed by one-way ANOVA, with post-hoc Tukey HSD. Correlations between variables were analysed using Pearson's correlation test.

Results

Baseline Characteristics of Participants

The data below shows the characteristics of the 86 people based on age category, gender, body mass index (BMI), blood pressure, fasting blood sugar level, and lipid profile.

Based on Table 1, the data homogeneity is known to be different. To ensure that in this study, LP-PLA and Monocyte levels were not affected by other factors (age, sex, body mass index (BMI), blood pressure and fasting blood sugar), we analyzed using the Kruskal Wallis test. The data is homogeneous. Based on these tests, gender, age, body mass index (BMI), blood pressure, fasting blood sugar, and lipid profiles showed significance for monocytes. In Lp-PLA2, significant differences come from gender, age, body mass index (BMI), blood pressure and fasting blood sugar ($p < 0.05$).

The normality test for monocyte levels and Lp-PLA2 produced by Kolmogorov-Smirnov analysis resulted in $p = 0.072$ and $p = 0.115$, respectively, with a probability of $p = 0.200$ and $p = 0.007$. Therefore, it can be known that the monocyte data is declared normally distributed ($p > 0.05$); meanwhile, Lp-PLA2 is not.

Based on Spearman correlation analysis, the relationship between monocytes and Lp-PLA2 produced a probability value of 0.028. These results indicate that the probability is less than the level of significance ($p < 0.05$). Thus, it can be stated that there is a significant relationship between monocytes and

Table 1. Baseline characteristics of the participants

Variable	Percentage	Lp-PLA2 (ng/mL)		Monocyte		
		Mean	p-value	Number of cells per 10 ³ /μL	Percentage	p-value
Gender						
Male	56	0.105	0.032	0.287	7.26	0.042
Female	44	0.105		0.253	6.69	
Age						
30–49	28	0.103	0.025	0.281	7.18	0.034
50–69	59	0.107		0.265	6.89	
70–89	13	0.103		0.283	7.14	
Body mass index (kg/m²)						
Underweight	7	0.107	0.024	0.287	7.00	0.036
Normal weight	40	0.105		0.269	6.78	
Overweight	23	0.103		0.274	7.24	
Obese Class I	17	0.107		0.250	7.16	
Obese Class II	12	0.104		0.295	7.45	
Obese Class III	1	0.104		0.420	8.90	
Blood pressure (mmHg)						
90/60–130/80	31	0.108	0.028	0.252	6.57	0.031
> 130/80	69	0.104		0.283	7.25	
Fasting blood sugar (mg/dL)						
< 70	52	0.106	0.039	0.268	6.75	0.045
70–99	20	0.105		0.264	7.46	
> 99	28	0.104		0.282	7.89	
Lipid profile (mg/dL)						
Dyslipidemia	87	0.105	0.072	0.271	7.01	0.041
Non-dyslipidemia	13	0.107		0.274	6.97	

Lp-PLA2. The positive correlation coefficient indicates that the relationship between monocyte and Lp-PLA2 concentration is directly proportional, meaning: higher monocyte levels matched higher Lp-PLA2 concentrations. The correlation coefficient of 0.789 is categorised as very strong. This result means that the relationship between monocyte levels and Lp-PLA2 concentration is significant and strong.

Discussion

Lp-PLA2 is secreted by inflammatory cells; one of them is monocytes. Lp-PLA2 binds with oxidised low-density lipoprotein (oxLDL) and breaks it into lysoPC and OxNEFA [28]. Lp-PLA2 inducing formation lipid mediator through hydrolysis of fatty acids. It has been shown that increase in the concentration of Lp-PLA2 in the blood indicates signs of plaque formation. It has also been shown that inhibiting the activity of Lp-PLA2 reduced the lesion of intimal and progressive atherosclerosis [18]. Research also mentions that an increase in inflammatory cells induces the concentration of Lp-PLA2 to increase on the atherosclerotic plaque [17, 26].

Lp-PLA2 is related to atherosclerosis risk factors such as gender, age, BMI, blood pressure, blood glucose level and lipid profile. Gender independently influences the existence of Lp-PLA2:

males have a high tendency towards high Lp-PLA2 concentrations compared to females [5, 31, 34]. This research also proves a significant relationship between gender and Lp-PLA2. A high concentration of Lp-PLA2 participants aged 62 years old and below indicates an increase in the risk factors of coronary heart disease; meanwhile, this is not applicable for those above 62 years old [11]. Research has also shown a significant relationship between age and Lp-PLA2. High BMI causes the concentration of Lp-PLA2 to increase [10]. This research also proves a significant relationship between BMI and Lp-PLA2. In the case of hypertension, blood pressure is directly proportional to the concentration of Lp-PLA2, where both increase together [15]. The research also proves a significant relationship between blood pressure and Lp-PLA2. Research has shown that diabetic retinopathy patients have a high concentration of Lp-PLA2. This finding indicates that high sugar content in the blood will induce an increase in Lp-PLA2 concentration [27]. The re-

Table 2. Statistical characteristics of the variables

Variable		Min	Max	Mean	Standard deviation
Monocyte	Percentage (%)	4.2	11	6.99	1.49
	Number (10 ³ /μL)	0.17	0.42	0.27	0.06
Concentration of Lp-PLA2		0.08	0.13	0.11	0.01

search also proves a significant relationship between fasting blood sugar and Lp-PLA2. Furthermore, patients with dyslipidemia undergo hypolipidemic medication for LDL level and Lp-PLA2 concentration in the blood [25]. But the research shows there is no significant relationship between lipid profile and Lp-PLA2.

This research shows that the concentration of Lp-PLA2 is high in the population with risk factors such as male, increase in age, non-smokers, underweight, normal blood pressure, low fasting blood sugar, and non-dyslipidemia. Meanwhile, the concentration of Lp-PLA2 is low in the population with risk factors such as female, young age group, smokers, increase in BMI, increase in blood pressure, increase in blood glucose level, and the condition of dyslipidemia. In addition, there was a significant relationship between Lp-PLA2 with gender, age, BMI, blood pressure and fasting blood sugar.

Based on the results received, the mean number and percentage of monocytes were high in: males; the age group of 30–49; smokers; obese class III; high blood pressure; high blood sugar level; and the population with dyslipidemia condition. Meanwhile, the mean number and percentage of monocyte were low in: the female age group of 50–69; non-smokers; normal BMI; normal blood pressure; the population with low blood sugar level; and the sample population with non-dyslipidemia condition. Based on previous research on monocytes, it is proven that risk factors can increase monocyte number and percentage. Although the difference in the result of monocyte received compared with previous research related to gender and number and percentage, females have a high number and percentage compared to males. Still, there was a significant relationship between gender and monocyte levels. There is a difference in the result received compared to previous research, which shows an increase in the age group lead to an increase in number and percentage, which proves the significant relationship between age and Lp-PLA2. Research shows BMI is directly proportional to the number and percentage cause both increases together, proving a significant relationship between BMI and monocytes. The increase in blood pressure and dyslipidemia will increase in number and percentages of monocytes. Both prove that it has a significant relationship with Lp-PLA2.

Monocytes in atherosclerotic lesions produce foam cells by breaking down oxLDL that contain lipid droplets. The accumulation of foam cells contributes to lipid storage and atherosclerotic plaque growth. The atherosclerotic plaque has a decreased ability to migrate the foam cells, leading to the resolution of inflammation and the development of other lesions into complex atherosclerotic plaques [22]. Some of the risk factors of atherosclerosis, such as gender, age, body mass index (BMI), blood pressure, blood glucose level, and lipid profile, seem

related to the number and percentage of monocytes in the body.

Previous research shows a relationship between gender and monocyte number and percentage. Females have a higher number and percentage of monocyte than males, due to the estrogen hormone [24]. Research shows that a body mass index (BMI) in the obese category will increase monocyte number and percentage [23]. Also, high blood pressure causes the number and percentage of monocytes to increase [20]. Research shows that the number and percentage increase in patients with dyslipidemia is due to the LDL elevation [19, 30].

Monocytes also produce Lp-PLA2 [2]. Based on the research done, high activity of Lp-PLA2 is one of the independent factors of inflammation and risk factors of cardiovascular disease. Research proves that a high concentration of Lp-PLA2 causes an increase in the risk of stroke and coronary heart disease [6]. Meanwhile, monocytes produce oxidised LDL and HIF-1A, which will induce intercellular adhesion molecule (ICAM-1), vascular cell-1 adhesion molecule (VCAM-1), and enhance the endothelial adhesive properties in a proinflammatory-like effect [3]. Monocytes also produce Lp-PLA2 to break down oxLDL into lysoPC and OxNEFA. These particles will cause fibrous cap formation on the blood vessel [4]. Based on the results obtained from this research, there is a significant relationship between monocyte levels and Lp-PLA2. Furthermore, Lp-PLA2 is directly proportional to monocytes. Therefore, it can be seen that both can be used to detect risk in the early stages of atherogenesis, hopefully with appropriate therapy to prevent severe disease.

Conclusion

There is a significant relationship between monocytes and Lp-PLA2, and Lp-PLA2 is directly proportional to monocyte levels. This research proves that Lp-PLA2 tends to act as proinflammatory factor. Further research needs to be done to investigate Lp-PLA2 activity because it seems like the concentration and activity of Lp-PLA2 plays a role in formation of Lp-PLA2 products, such as LysoPC and OxNEFA, which play different roles in atherosclerogenesis.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest

Acknowledgements

The authors would thank the Ministry of Education and Culture, Republic of Indonesia, for research support and all participants contributing to this research.

References

- Anzola L.K., Rivera J.N., Ramirez J.C., Signore A., Mut F. Molecular imaging of vulnerable coronary plaque with radiolabeled somatostatin receptors (SSTR). *J. Clin. Med.*, 2021, vol. 10, no. 23: 5515. doi: 10.3390/jcm10235515
- Ashraf M.A., Nookala V. Biochemistry of platelet activating factor. In: StatPearlsTreasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557392> (07.01.2022)
- Badimon L., Padró T., Vilahur G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *Eur. Heart J. Acute Cardiovasc. Care*, 2012, vol. 1, no. 1, pp. 60–74. doi: 10.1177/2048872612441582
- Badimon L., Vilahur, G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J. Intern. Med.*, 2014, vol. 276, no. 6, pp. 618–632. doi: 10.1111/joim.12296
- Brilakis E., Khera A., McGuire D., See R., Banerjee S., Murphy S., de Lemos J. Influence of race and sex on lipoprotein-associated phospholipase A2 levels: observations from the Dallas Heart Study. *Atherosclerosis*, 2008, vol. 199, no. 1, pp. 110–115.
- Cai A., Li G., Chen J., Li X., Li L., Zhou Y. Increased serum level of Lp-PLA2 is independently associated with the severity of coronary artery diseases: a cross-sectional study of Chinese population. *BMC Cardiovasc. Disord.*, 2015, vol. 15, no. 14. doi: 10.1186/s12872-015-0001-9
- Cardiovascular and all-cause mortality over a 23-year period among Chinese with newly diagnosed diabetes in the Da Qing IGT and diabetes study. *Diabetes Care*, 2015, vol. 38, no. 7, pp. 1365–1371. doi: 10.2337/dc14-2498
- Coleman J.F. Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2010, vol. 34, no. 1: 132. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181bc5f0f
- Colley K.J., Wolfert R.L., Cobble M.E. Lipoprotein associated phospholipase A2: Role in atherosclerosis and utility as a biomarker for cardiovascular risk. *EPMA J.*, 2011, vol. 2, no. 1, pp. 27–38. doi: 10.1007/s13167-011-0063-4
- Da Silva I., Timm A., Damasceno N. Influence of obesity and cardiometabolic makers on lipoprotein-associated phospholipase A2 (LP-PLA2) activity in adolescents: the healthy young cross-sectional study. *Lipids Health Dis.*, 2013, vol. 12, no. 1: 19. doi: 10.1186/1476-511X-12-19
- Franeková J., Kettner J., Kubiček Z., Jabor A. The importance of age and statin therapy in the interpretation of LP-PLA2 in ACS patients, and relation to CRP. *Physiol. Res.*, 2015, vol. 64, pp. 229–236. doi: 10.33549/physiolres.932765
- Gencer S., Evans B.R., van der Vorst E., Döring Y., Weber C. Inflammatory chemokines in atherosclerosis. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 2: 226. doi: 10.3390/cells10020226
- Hilgendorf I., Swirski F.K., Robbins C.S. Monocyte fate in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2015, vol. 35, no. 2, pp. 272–279. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303565
- Jaipradsad A.S., Lip G.Y.H., Silverman S., Shantsila E. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2014, vol. 63, no. 1, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.jacc.2013.09.019
- Kim M., Yoo H., Kim M., Ahn H., Park J., Lee S., Lee J. Associations among oxidative stress, Lp-PLA 2 activity and arterial stiffness according to blood pressure status at a 3.5-year follow-up in subjects with prehypertension. *Atherosclerosis*, 2017, vol. 257, pp. 179–185. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.01.006
- Libby P., DiCarli M., Weissleder R. The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets. *J. Nucl. Med.*, 2010, vol. 51, suppl. 1, pp. 33S–37S. doi: 10.2967/jnumed.109.069633
- Lin P., Ji H.H., Li Y.J., Guo S.D. Macrophage plasticity and atherosclerosis therapy. *Front. Mol. Biosci.*, 2021, vol. 8: 679797. doi: 10.3389/fmolb.2021.679797
- Lind L., Simon T., Johansson L., Kotti S., Hansen T., Machecourt J., Ninio E., Tedgui A., Danchin N., Ahlström H., Mallat Z. Circulating levels of secretory- and lipoprotein-associated phospholipase A2 activities: relation to atherosclerotic plaques and future all-cause mortality. *Eur. Heart J.*, 2012, vol. 33, no. 23, pp. 2946–2954.
- Linton M.R.F., Yancey P.G., Davies S.S., Jerome W.G., Linton E.F., Song W.L., Doran A.C., Vickers K.C. The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. 2019. In: Endotext. Eds.: Feingold K.R., Anawalt B., Boyce A., Chrousos G., de Herder W.W., Dhatariya K., Dungan K., Hershman J.M., Hofland J., Kalra S., Kalsas G., Koch C., Kopp P., Korbonits M., Kovacs C.S., Kuohung W., Laferrère B., Levy M., McGee E.A., McLachlan R., Morley J.E., New M., Purnell J., Sahay R., Singer F., Sperling M.A., Stratakis C.A., Trencle D.L., Wilson D.P. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343489> (07.01.2022)
- Maekawa Y., Anzai T., Yoshikawa T., Asakura Y., Takahashi T., Ishikawa S., Ogawa S. Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2002, vol. 39, no. 2, pp. 241–246. doi: 10.1016/S0735-1097(01)01721-1
- Moore K.J., Sheedy F.J., Fisher E.A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, vol. 13, no. 10, pp. 709–721. doi: 10.1038/nri3520
- Rafieian-Kopaei M., Setorki M., Dousti M., Baradaran A., Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int. J. Prev. Med.*, 2014, vol. 5, no. 8, pp. 927–946.
- Rogacev K.S., Ulrich C., Blömer L., Hornof F., Oste K., Ziegelin, M., Heine G.H. Monocyte heterogeneity in obesity and sub-clinical atherosclerosis. *Eur. Heart J.*, 2010, vol. 31, no. 3, pp. 369–376. doi: 10.1093/eurheartj/ehp308
- Roved J., Westerdahl H., Hasselquist D. Sex differences in immune responses: hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences. *Horm. Behav.*, 2017, vol. 88, pp. 95–105. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.11.017
- Saougos V., Tambaki A., Kalogirou M., Kostapanos M., Gazi I., Wolfert R., Elisaf M., Tselepis A. Differential effect of hypolipidemic drugs on lipoprotein-associated phospholipase A2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2007, vol. 27, no. 10, pp. 2236–2243. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.147280
- Sertić J., Lovrić J., Bozina T., Skorić B. and Reiner Z. Does LP-PLA2 determination help predict atherosclerosis and cardiocerebrovascular disease? *Acta Med. Croatica*, 2010, vol. 64, no. 4, pp. 237–245.
- Siddiqui M., Kennedy G., Carr F., Doney A., Pearson E., Morris A., Johnson T., McLaughlin M., Williams R. Palmer C. Lp-PLA2 activity is associated with increased risk of diabetic retinopathy: a longitudinal disease progression study. *Diabetologia*, 2018, vol. 61, no. 6, pp. 1344–1353.

28. Steen D.L., O'Donoghue M.L. LP-PLA2 Inhibitors for the reduction of cardiovascular events. *Cardiol. Ther.*, 2013, vol. 2, no. 2, pp. 125–134. doi: 10.1007/s40119-013-0022-3
29. Stone N.J., Robinson J.G., Lichtenstein A.H., Bairey Merz C.N., Blum C.B., Eckel R.H., Goldberg A.C., Gordon D., Levy D., Lloyd-Jones D.M., McBride P., Schwartz J.S., Shero S.T., Smith S.C. Jr., Watson K., Wilson P.W. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2014, vol. 63, no. 25, part B, pp. 2889–2934. doi: 10.1016/j.jacc.2013.11.002
30. Tolani S., Pagler T.A., Murphy A.J., Bochem A.E., Abramowicz S., Welch C., Nagareddy P.R., Holleran S., Hovingh G.K., Kuivenhoven J.A., Tall A.R. Hypercholesterolemia and reduced HDL-C promote hematopoietic stem cell proliferation and monocytosis: studies in mice and FH children. *Atherosclerosis*, 2013, vol. 229, no. 1, pp. 79–85. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.031
31. Wang J., Jin M., Chen Y., Yuan Y., Ruan Y., Lu G. Lp-PLA2, a potential protector of lung cancer patients complicated with pleural effusion from lung diseases, proves effective for the diagnosis and pathological classification of lung cancer. *Transl. Oncol.*, 2021, vol. 14, no. 4: 101030. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101030
32. Wihastuti T.A., Saka P.N.B., Sargowo D., Heriansyah T. The effect of darapladib administration to inflammation marker in early development of atherosclerosis: in vivo study for dyslipidemia model. *Eur. Heart. J.*, 2019, vol. 21 (suppl. F), p. F51.
33. World Health Organization (WHO). Cardiovascular Diseases (CVDs). 2017. URL: [\(https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (07.01.2022)
34. Zhang F., Guo J., Yang F., Zhou Y. Lp-PLA2 evaluates the severity of carotid artery stenosis and predicts the occurrence of cerebrovascular events in high stroke-risk populations. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2021, vol. 35, no. 3: e23691. doi: 10.1002/jcla.23691

Авторы:

Кумбойоно К., Школа сестринского дела, факультет наук о здоровье, Университет Бравиджая, г. Маланг, Индонезия;
Чомси И.Н., докторская программа медицинских наук, медицинский факультет, Университет Бравиджая, г. Маланг, Индонезия;
Виджаядас Д., программа медицинского обучения, медицинский факультет, Университет Бравиджая, г. Маланг, Индонезия;
Вихастути Т.А., Школа сестринского дела, факультет наук о здоровье, Университет Бравиджая, г. Маланг, Индонезия.

Authors:

Kumboyono K., School of Nursing, Faculty of Health Sciences, University of Brawijaya, Malang, Indonesia;
Chomsy I.N., Doctoral Program of Medical Science, Faculty of Medicine, University of Brawijaya, Malang, Indonesia;
Vijayadas D., Medical Study Program, Faculty of Medicine, University of Brawijaya, Malang, Indonesia;
Wihastuti T.A., School of Nursing, Faculty of Health Sciences, University of Brawijaya, Malang, Indonesia.

Поступила в редакцию 11.01.2022
Отправлена на доработку 08.02.2022
Принята к печати 21.03.2022

Received 11.01.2022
Revision received 08.02.2022
Accepted 21.03.2022

THE EFFICACY AND SAFETY OF THREE 30-DAY COURSES OF ALBENDAZOLE IN PATIENTS WITH NEUROCYSTICERCOSIS

C.T. Sinh^a, T.T. Thang^b, T.D. Thang^c, C.B. Loi^d, L.T. Anh^e

^a Vinh Medical University, Nghe An, Vietnam

^b Nghe An Eye Hospital, Nghe An, Vietnam

^c Thai Thuong Hoang Hospital, Nghe An, Vietnam

^d National Institute of Malaria, Parasitology and Entomology, Ha Noi, Vietnam

^e Vietnam Military Medical University, Ha Noi, Vietnam

Abstract. Albendazole is one of the drugs indicated for the treatment of neurocysticercosis. However, data on the treatment outcome of a long course of this drug is scarce. This study aims to investigate the efficacy and safety of three 30-day courses of albendazole in patients with neurocysticercosis. *Materials and methods.* The diagnosis of neurocysticercosis was based on epidemiological, clinical and laboratory criteria as guided by the Vietnamese Ministry of Health. Sixty patients with a mean age of 50.17 ± 10.03 years old, with 86.7% (95% CI: 77.8–95.5%) men, were involved in this study. Patients received three 30-day courses of albendazole with an intermittence of 20 days. Additional treatment included steroids, anticonvulsants or analgesics. Based on brain magnetic resonance imaging 6 months after the therapy, the efficacy was classified as cure (viable cysts not discernible), improvement (50% or more cysts disappeared or calcified) or inefficacy (changes in less than 50% of the cysts). The safety was determined based on the changes of biochemical parameters after each treatment course. *Results.* The most common clinical presentations were headache (90.0%, 95% CI: 82.2–97.8) and/or seizure (68.3%, 95% CI: 56.2–70.4), followed by other symptoms such as fainting, memory loss, and limb numbness. Active cysts were discovered in all cases and located mainly in the parenchymal region. After therapy, the rates of cure, improvement or inefficacy were 43.3% (95% CI: 30.4–56.2%), 51.7% (95% CI: 38.7–64.7%) and 5.0% (95% CI: 0–10.7%), respectively. Liver enzymes were slightly higher compared to those before therapy and mostly returned to normal ranges after drug interruption. Alanine aminotransferase levels before the 3rd course were higher than values before the first and second courses. No abnormalities in blood urea or creatinine after therapy were reported. *Conclusion.* Three 30-day cycles of albendazole appear to have good efficacy and tolerability in patients with neurocysticercosis.

Key words: neurocysticercosis, efficacy, safety, albendazole, long course.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ТРЕХ 30-ДНЕВНЫХ КУРСОВ АЛЬБЕНДАЗОЛА У БОЛЬНЫХ НЕЙРОЦИСТИЦЕРКОЗОМ

Шинь Ц.Т.¹, Тханг Ч.Т.², Тханг Т.Д.³, Лой К.Б.⁴, Ань Л.Ч.⁵

¹ Медицинский университет Винь, Нгеан, Вьетнам

² Глазная больница Нге Ан, Нгеан, Вьетнам

³ Больница Тхай Тхьонг Хоанг, Нгеан, Вьетнам

⁴ Национальный институт малярии, паразитологии и энтомологии, Ханой, Вьетнам

⁵ Вьетнамский военно-медицинский университет, Ханой, Вьетнам

Резюме. Альбендазол является одним из препаратов, показанных для лечения нейроцистицеркоза, однако данные об исходе лечения длительным курсом этого препарата немногочисленны. Настоящее исследование

Адрес для переписки:

Ле Чан Ань
160 Фунг Хунг, Ха Донг, Ханой, Вьетнам,
Вьетнамский военно-медицинский университет.
Тел.: +84 98 3289514. E-mail: anh_it@vmmu.edu.vn

Contacts:

Le Tran Anh
160 Phung Hung, Ha Dong, Ha Noi, Vietnam,
Vietnam Military Medical University.
Phone: +84 98 3289514. E-mail: anh_it@vmmu.edu.vn

Для цитирования:

Шинь Ц.Т., Тханг Ч.Т., Тханг Т.Д., Лой К.Б., Ань Л.Ч. Эффективность и безопасность трех 30-дневных курсов альбендазола у больных нейроцистицеркозом // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1143–1148. doi: 10.15789/2220-7619-TEA-1910

Citation:

Sinh C.T., Thang T.T., Thang T.D., Loi C.B., Anh L.T. The efficacy and safety of three 30-day courses of albendazole in patients with neurocysticercosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1143–1148. doi: 10.15789/2220-7619-TEA-1910

направлено на изучение эффективности и безопасности трех 30-дневных курсов альбендазола у пациентов с нейроцистицеркозом. *Материалы и методы.* Диагноз нейроцистицеркоза был основан на эпидемиологических, клинических и лабораторных критериях в соответствии с рекомендациями Министерства здравоохранения Вьетнама. В исследование вошли 60 пациентов мужского пола, средний возраст которых составил $50,17 \pm 10,03$ года, из них 86,7% являлись лицами мужского пола (95% ДИ: 77,8–95,5%). Пациенты получали три 30-дневных курса альбендазола с перерывом в 20 дней. Дополнительное лечение включало стероиды, противосудорожные препараты или анальгетики. На основании магнитно-резонансной томографии головного мозга через 6 месяцев после терапии эффективность классифицировали как излечение (жизнеспособные кисты не были различимы), улучшение (исчезновение или кальцификация 50% и более кист) или неэффективность (изменения были зарегистрированы менее чем в 50% кист). Безопасность определяли по изменению биохимических показателей после каждого курса лечения. *Результаты.* Наиболее частыми клиническими проявлениями были головная боль (90,0%, 95% ДИ: 82,2–97,8), судороги (68,3%, 95% ДИ: 56,2–70,4), за которыми следовали такие симптомы как обморок, потеря памяти, онемение конечностей. Активные кисты были обнаружены во всех случаях и располагались преимущественно в паренхиме головного мозга. После терапии частота излечения, улучшения и неэффективности составила 43,3% (95% ДИ: 30,4–56,2%), 51,7% (95% ДИ: 38,7–64,7%) и 5,0% (95% ДИ: 0–10,7%) соответственно. Показатели печеночных ферментов в сыворотке крови печени были несколько выше по сравнению с таковыми до терапии и в большинстве случаев возвращались к нормальным значениям после прекращения приема препарата. Уровень аланинаминотрансферазы перед 3-м курсом был выше, чем до первого и второго курсов. Отклонений в показателях мочевины и креатинина в крови после терапии не зарегистрировано. *Выводы.* Три 30-дневных цикла альбендазола характеризуются хорошей эффективностью и переносимостью у пациентов с нейроцистицеркозом.

Ключевые слова: нейроцистицеркоз, эффективность, безопасность, альбендазол, длительный курс.

Introduction

Cysticercosis is a disease caused by the larval stages (cysticercus) of the pork tapeworm (*Taenia solium*). The disease is endemic in most low- and middle-income countries and also reported in industrial countries [24]. The clinical manifestations of the disease depend on the number, location, as well as response of the body human to these cysticerci [9]. Neurocysticercosis (NCC) is the most common form of the disease and responsible for significant morbidity. Neurocysticercosis is the cause of 30% of all epilepsy cases worldwide in addition to other neurological symptoms including chronic headaches, focal neurologic deficits, intracranial hypertension, and cognitive decline [25].

Treatment of NCC is mostly symptomatic. Nevertheless, antiparasitic drugs for the destruction of cysts are important [6]. Between the two anthelmintics most commonly used, albendazole may be superior to praziquantel because of its better penetration into the central nervous system, lower cost, and lesser interaction with other drugs [19]. Several studies have investigated the efficacy of albendazole, and a dose of 15 mg/kg/day has generally been accepted [2, 3, 10, 11, 12]. However, there is still considerable disagreement concerning the length of therapy. Most studies have relied on a one to four-week course, with observed cyst disappearance in 25% to 37% of case [2, 3, 10, 11, 12]. Due to the low efficacy of this regime, a longer duration (more than one 4-week course) might be an appropriate approach, but there is little information on the treatment outcome of this prolonged regime [17]. This study aims to investigate the efficacy and safety of three 30-day courses of albendazole in patients with NCC.

Materials and methods

Ethical consideration. This research is part of the thesis work for the fulfilment of Doctor of Philosophy in Health Studies. It obtained clearance from the ethics committee of the Vietnam National Institute of Malaria, Parasitology and Entomology (NIMPE). Written or verbal consent was obtained from all the patients or their legal representatives.

Study design. This prospective study was carried out at the Specialized Parasitic Clinic, NIMPE during January 2017 and December 2020. All patients visiting the clinic with clinical symptoms/signs suspected of NCC were screened for the infection. Criteria for inclusion were subjects more than five years old and diagnosed with NCC, with willingness to complete antiparasitic therapy and follow-up examination after treatment. Criteria for exclusion were pregnant women, subjects exhibiting acute diseases or concurrent parasitic diseases, or having a known history of allergy to benzimidazole.

After informed consent was obtained, a detailed history of symptoms, duration and progression of the disease, in addition to sociodemographic data, was recorded. A careful systemic and neurologic examination was done, followed by laboratory investigations. Blood examination included blood cell counts and standard tests of biochemistry. Serum enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for certain infections common in Vietnam (cysticercosis, fascioliasis, strongyloidiasis, gnathostomiasis, toxocarosis, amebiasis) was performed using reagents from Cortez Diagnostics Inc. (USA) following manufacturer instructions. Brain magnetic resonance imaging (MRI) was

used to determine the number and stages of cysts. Stool samples were collected and examined for intestinal helminths or protozoans.

The treatment. Patients with vesicular, colloidal, or granular cysts on MRI received three 30-day courses of albendazole at a daily dose of 15 mg/kg of body weight. The intermittence between the courses was 20 days. Before taking albendazole, patients received praziquantel 20 mg/kg to treat adult worms [22]. Additional treatment included steroids to decrease inflammation and anticonvulsant or analgesic drugs as needed.

Follow-up. Clinical assessment was performed at the start of and during therapy. Blood samples were taken at the beginning and the end of all three courses. Brain MRI was performed 6 months after completion of therapy to assess treatment outcome.

Definition. As guided by the Vietnamese Ministry of Health, diagnosis of cysticercosis was based on epidemiological, clinical, and laboratory criteria based on well-known ones [4, 5]. Epidemiologic criteria include ingestion of raw vegetables or living in endemic areas. Suggestive manifestations of NCC are late-onset seizures, focal neurologic deficits, intracranial hypertension, chronic headaches, or cognitive decline. Laboratory criteria are: (1) positive biopsy results of cysts; (2) pathognomonic lesions on computed tomography (CT) or MRI (cysts with “hole-with-dot” appearance); (3) parasites discovered by fundoscopic examination; and (4) a positive result by serum ELISA [22]. On MRI, location of cysts was grouped into cortex/subcortex, hemisphere, subarachnoid, or intraventricular. Based on stage, they were classified as viable (vesicular, colloidal, granular) or dead (calcified) cysts [7, 26]. Treatment outcome was classified based on the resolution of cystic lesions as follows: complete resolution/cure wherein viable cysts were not discernible on MRI; partial resolution/improvement wherein 50% or more cysts disappeared or calcified; or no resolution/inefficacy wherein changes were reported in less than 50% of the cysts. Reference ranges were: 1–35 U/L for aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT); 1.8–7.1 mmol/L for urea; and 44–97 μ mol/L (female) and 53–106 μ mol/L (male) for creatinine [23]. Mild elevation was designated as liver enzyme levels less than five times the upper limit of the normal value. Greater than 15 times the upper limit was designated as severe elevation.

Statistical analysis. Data analysis was performed with SPSS 16.0 (SPSS-IBM Company). Categorical variables were expressed as case number (n) and percentages, while numerical variables were expressed as mean and standard deviation (\pm SD). A paired sample t-test was used to determine the mean difference of continuous variables at different time points. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Sixty patients aged between 28–68 years participated in the study. The male to female ratio was 6.5/1. All patients met the epidemiologic criteria due to a history of eating raw vegetables in addition to living in north and central Vietnam where active transmission of taeniasis and cysticercosis has been reported. The most common clinical presentations were headache and/or seizure, followed by other symptoms such as fainting, memory loss, or limb numbness. Only one patient had a history of defecating proglottides or subcutaneous cysts. On brain MRI, cysts were located in different locations, but mainly in the parenchymal region (cerebral hemisphere (83.3%), cortical/subcortical region (41.7%), or cerebellum (10.0%). Multiple cysts (≥ 2) were discovered in 48/50 (96%) cases in the hemisphere, 14/25 (56%) cases in cortical/subcortical regions, and 3/6 (50%) cases in the cerebellum. In the intraventricular or subarachnoid region, only a single cyst was discovered. Vesicular cysts occurred in 60 (100%) cases, and calcified cysts in one case (cerebellum). Elevation of AST occurred in 19 (31.7%) patients and of ALT in 24 (40.0%) patients. Average liver enzyme levels were slightly higher than normal reference, whereas the levels of urea and creatinine were within the normal ranges (Table 1).

Table 1. Baseline patient characteristics (n = 60)

Variable		n	% (95% CI)
Age (years, $\bar{X}\pm$SD)		50.17 \pm 10.03	
Gender	Female	8	13.3 (4.8–22.2)
	Male	52	86.7 (77.8–95.5)
Occupation	Farmer	39	65.5 (52.6–77.4)
	Other jobs	21	35.5 (22.6–47.4)
Manifestation	Headache	54	90.0 (82.2–97.8)
	Seizure	41	68.3 (56.2–70.4)
	Memory loss	23	19.2 (12.3–34.4)
	Fainting	17	28.3 (16.6–40.1)
	Limb numbness	12	20.0 (9.6–30.4)
	Vomiting, nausea	9	15.0 (5.7–24.3)
	Balance disorders	6	10.0 (2.2–17.8)
	Muscle weakness	6	10.0 (2.2–17.8)
	Blurred vision	2	3.3 (0.1–8.0)
Cyst site*	Hemisphere	50	83.3 (73.6–93.0)
	Cortical/subcortical	25	41.7 (28.8–54.4)
	Cerebellum	6	10.0 (2.2–17.8)
	Ventricles	1	1.7 (0–0.5)
	Subarachnoid spaces	1	1.7 (0–0.5)
Biochemical parameters	AST (U/L, $\bar{X}\pm$SD)	38.16 \pm 27.45	
	ALT (U/L, $\bar{X}\pm$SD)	35.87 \pm 19.07	
	Urea (mmol/L, $\bar{X}\pm$SD)	5.43 \pm 1.03	
	Creatinine (mmol/L, $\bar{X}\pm$SD)	80.30 \pm 14.12	

Note. *Same patients with cysts at different sites.

Table 2. Efficacy of antiparasitic treatment (n = 60)

	n	% (95% CI)
Cure	26	43.3 (30.4–56.2)
Improvement	31	51.7 (38.7–64.7)
Inefficacy	3	5.0 (0–10.7)

After antiparasitic therapy, almost all (95.0%) patients had radiological improvement, but a complete resolution was reported in less than half of the participants (43.3%). There were two patients with no cystic resolution, and one patient showed an increase in the number of cysts six months after treatment (Table 2). Clinical examination showed that 23/41 (56.1%) patients with seizures were completely cured, and 25/54 (46.3%) patients having headaches recovered. Of the patients with loss of memory or fainting, the rates of complete recovery were (6/14) 42.9% and (11/17) 64.7%, respectively.

Table 3 shows changes in biochemical parameters after treatment. The levels of liver enzymes after treatment were all above the normal ranges and significantly higher compared to those before the antiparasitic course. The percentages of patients with increased AST after the 1st, 2nd and 3rd course were 66.7%, 75% and 85% respectively. There were 50 (83.3%), 55 (91.7%), and 49 (81.7%) cases having elevated ALT levels after the first, second, and third course. Most of them had mild or moderate elevation; only one patient had a severe elevation of liver enzymes. After drug interruption, liver enzyme levels mostly returned to normal ranges equivalent to pretreatments levels. However, ALT levels before the 3rd course were higher than the baseline as well as the normal range. Urea and creatinine concentrations were within normal limits at all examinations. The only exception was that urea concentration after the 2nd and 3rd course increased slightly compared to levels before the course but was within normal ranges. During therapy, some patients developed headaches, vomiting, or exacerbation of seizures.

Table 3. Biochemical parameters before and after therapy (n = 60)

Parameters	Course	Before	After	p-value
AST (U/L, $\bar{X}\pm SD$)	1	38.16±27.45	72.43±140.33	0.036
	2	34.20±13.34	54.02±43.81	0.000
	3	39.14±14.44	61.54±64.45	0.003
ALT (U/L, $\bar{X}\pm SD$)	1	35.87±19.07	93.67±110.31	0.000
	2	36.71±17.48	75.91±45.14	0.000
	3	44.63±22.16*	83.30±105.73	0.002
Urea (mmol/L, $\bar{X}\pm SD$)	1	5.43±1.03	5.31±1.12	0.478
	2	5.06±0.62	5.29±0.84	0.023
	3	4.99±0.57	5.48±0.81	0.000
Creatinine (mmol/L, $\bar{X}\pm SD$)	1	80.30±14.12	80.40±10.18	0.946
	2	79.46±8.06	79.19±8.42	0.746
	3	79.30±7.12	80.78±6.99	0.052

Note. *The mean ALT concentration before the third course was higher than that before the first and the second course ($p < 0.001$).

Discussion

This study was carried out to investigate the efficacy and safety of a prolonged regime of albendazole in patients with NCC. Our results suggest that three 30-day cycles of albendazole have good efficacy against NCC. Most of the patients (95%) had radiological improvement, and a complete clearance of cysts on MRI was reported in 43.3% of cases. Clinical examination showed that about half of the patients had improvement, but these results were not included in the efficacy evaluation. Clinical evaluation has been considered inappropriate because some symptoms, such as seizures, can present long after cyst clearance [7, 9]. The complete resolution rate in our patients (43.3%) was slightly higher than that in previous observations (reporting cure rates ranging from 25% to 37%) [2, 3, 10, 11]. This difference in the efficacy could be due to the longer duration of therapy (90 days) in our study compared to previously cited studies (7–28 days) [2, 3, 10, 11]. Some authors have reported that a long duration of albendazole may have no additional benefit compared to the short ones [15, 20]. Nevertheless, Garcia et al. (1997) noted a significant difference in the number of cysts persisting at day 360 among patients taking a short (7-day) and long (14-day) schedule of albendazole [8]. An overly-short duration (one week) may not change the natural course of NCC [16]. Our results are supported by another observation [17] and suggest that an extension of the duration of albendazole therapy may be a good choice for patients with NCC.

Results of safety assessment showed that this prolonged regime of albendazole seems to have a favorable safety profile. Liver enzymes were only mildly and temporarily elevated, while urea and creatinine concentrations were within normal limits. The proportion of patients with elevated liver enzymes in our study (> 80%) was far higher than that usually reported in those taking albendazole (10–20%) [14]. A possible reason for this difference was the high rate of patients with increased liver enzymes before therapy

(Table 1). Another reason could be the prolonged use of albendazole (90 days) compared to short courses (7–28 days) used in most previous studies [2, 3, 10, 11]. Although a high rate of patients with elevated liver enzymes was seen, the proportion of severe elevation was low (1.7%); this is in agreement with a scarcity of reported cases of albendazole-induced liver injury [1, 13, 18]. The unchanged levels of urea and creatinine in our patients are similar to other results [17]. During therapy, some patients developed headaches, vomiting, or exacerbation of seizures. These manifestations could be adverse reactions or predictors of drug effectiveness, so they are not included in safety assessments [21].

Some limitations remain in our study. There were only a small number of patients willing to complete treatment and undergo final assessment six months

after therapy, so the small sample size is unavoidable. A control group taking placebo drugs is lacking as this is not acceptable practice in our country.

Conclusion

Three 30-day cycles of albendazole appear to have favorable outcomes in patients with neurocysticercosis. Almost all patients had an improvement in cystic lesions and the rate of complete disappearance is encouraging. This regime has good tolerability, but monitoring of liver transaminase levels is critical.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

References

- Bilgic Y., Yilmaz C., Cagin Y.F., Atayan Y., Karadag N., Harputluoglu M.M.M. Albendazole induced recurrent acute toxic hepatitis: a case report. *Acta Gastroenterol. Belg.*, 2017, vol. 80, no. 2, pp. 309–311.
- Carpio A., Kelvin E.A., Bagiella E., Leslie D., Leon P., Andrews H., Hauser W.A., Effects of albendazole treatment on neurocysticercosis: a randomised controlled trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2008, vol. 79, no. 9, pp. 1050–1055. doi: 10.1136/jnnp.2008.144899
- Carpio A., Santillán F., León P., Flores C., Hauser, W.A. Is the course of neurocysticercosis modified by treatment with anthelmintic agents? *Arch. Intern. Med.*, 1995, vol. 155, no. 18, pp. 1982–1988.
- Del Brutto O.H., Nash T.E., White A.C. Jr., Rajshekhar V., Wilkins P.P., Singh G., Vasquez C.M., Salgado P., Gilman R.H., Garcia H.H. Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis. *J. Neurol. Sci.*, 2016, vol. 372, pp. 202–210. doi: 10.1016/j.jns.2016.11.045
- Del Brutto O.H., Rajshekhar V., White A.C. Jr., Tsang V.C., Nash T.E., Takayanagui O.M., Schantz P.M., Evans C.A., Flisser A., Correa D., Botero D., Allan J.C., Sarti E., Gonzalez A.E., Gilman R.H., Garcia H.H. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology*, 2001, vol. 57, no. 2, pp. 177–183. doi: 10.1212/wnl.57.2.177
- Fogang Y.F., Savadogo A.A., Camara M., Toffa D.H., Basse A., Sow A.D., Ndiaye M.M. Managing neurocysticercosis: challenges and solutions. *Int. J. Gen. Med.*, 2015, vol. 8, pp. 333–344. doi: 10.2147/IJGM.S73249
- García H.H., Del Brutto O.H. Imaging findings in neurocysticercosis. *Acta Trop.*, 2003, vol. 87, no. 1, pp. 71–78. doi: 10.1016/s0001-706x(03)00057-3
- García H.H., Gilman R.H., Horton J., Martínez M., Herrera G., Altamirano J., Cuba J.M., Rios-Saavedra N., Verastegui M., Boero J., Gonzalez A.E. Albendazole therapy for neurocysticercosis. *Neurology*, 1997, vol. 48, no. 5, pp. 1421–1427. doi: 10.1212/wnl.48.5.1421
- García H.H., Gonzalez A.E., Evans C.A.W., Gilma, R.H. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet*, 2003, vol. 362, no. 9383, pp. 547–556. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14117-7
- García H.H., Gonzales I., Lescano A.G., Bustos J.A., Zimic M., Escalante D., Saavedra H., Gavidia M., Rodriguez L., Najar E., Umeres H., Pretell E.J. Efficacy of combined antiparasitic therapy with praziquantel and albendazole for neurocysticercosis: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet. Infect. Dis.*, 2014, vol. 14, no. 8, pp. 687–695. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70779-0
- García H.H., Lescano A.G., Gonzales I., Bustos J.A., Pretell E.J., Horton J., Saavedra H., Gonzalez A.E., Gilman R.H. Cysticidal efficacy of combined treatment with praziquantel and albendazole for parenchymal brain cysticercosis. *Clin. Infect. Dis.*, 2016, vol. 62, no. 11, pp. 1375–1379. doi: 10.1093/cid/ciw134
- García H.H., Pretell E.J., Gilman R.H., Martínez S.M., Moulton L.H., Del Brutto O.H., Herrera G., Evans C.A.W., Gonzalez A.E. A trial of antiparasitic treatment to reduce the rate of seizures due to cerebral cysticercosis. *N. Engl. J. Med.*, 2004, vol. 350, no. 3, pp. 249–258. doi: 10.1056/NEJMoa031294
- Hong S.T. Albendazole and praziquantel: review and safety monitoring in Korea. *Infect. Chemother.*, 2018, vol. 50, no. 1, pp. 1–10. doi: 10.3947/ic.2018.50.1.1
- Horton R. Albendazole in treatment of human cystic echinococcosis: 12 years of experience. *Acta Trop.*, 1997, vol. 64, no. 1–2, pp. 79–93. doi: 10.1016/s0001-706x(96)00640-7
- Johnson N., Saini A.G., Malhi P., Khandelwal N., Singhi P. Comparison of long-term outcomes between 7 days and 28 days albendazole monotherapy in the treatment of single-lesion neurocysticercosis in children. *J. Child Neurol.*, 2021, vol. 37, no. 1, pp. 28–34. doi: 10.1177/08830738211035864
- Padma M., Behari M., Misra N., Ahuja G. Albendazole in neurocysticercosis. *Natl Med. J. India.*, 1995, vol. 8, no. 6, pp. 255–258.
- Pandey S., Malhotra H.S., Garg R.K., Malhotra K.P., Kumar N., Rizvi I., Jain A., Kohli N., Verma R., Sharma P., Uniyal R., Pandey S. Quantitative assessment of lesion load and efficacy of 3 cycles of albendazole in disseminated cysticercosis: a prospective evaluation. *BMC Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 1: 220. doi: 10.1186/s12879-020-4891-5
- Piloiu C., Dumitrascu D.L. Albendazole-induced liver injury. *Am. J. Ther.*, 2021, vol. 28, no. 3, pp. e335–e340. doi: 10.1097/

MJT.0000000000001341

19. Singhi P. Neurocysticercosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.*, 2011, vol. 4, no. 2, pp. 67–81. doi: 10.1177/1756285610395654
20. Singhi P., Dayal D., Khandelwal N. One week versus four weeks of albendazole therapy for neurocysticercosis in children: a randomized, placebo-controlled double blind trial. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2003, vol. 22, no. 3, pp. 268–272. doi: 10.1097/01.inf.0000055095.84136.a2
21. Sotelo J., Del Brutto O.H., Penagos P.J., Escobedo F., Torres B., Rodríguez-Carbajal J., Rubio-Donnadieu F. Comparison of therapeutic regimen of anticysticercal drugs for parenchymal brain cysticercosis. *J. Neurol.*, 2004, vol. 237, no. 2, pp. 69–72. doi: 10.1007/BF00314663
22. The Ministry of Health. The Guidelines for the diagnosis and treatment of clonorchiasis/opisthorchiasis, paragonimiasis, taeniasis and cysticercosis (Decision 1450/2004/QĐ-BYT) [in Vietnamese]. 2004.
23. Walker H., Hall W., Hurst J. (eds.). *Clinical Methods: The history, physical, and laboratory examinations*. Boston: Butterworths, 1990. 1087 p.
24. WHO. Landscape analysis: management of neurocysticercosis with an emphasis on low- and middle-income countries (WHO/HTM/NTD/NZD/2015.05). Geneva: World Health Organization, 2015. 62 p.
25. WHO. Taeniasis/cysticercosis, key facts. World Health Organization, 2022. URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis#:~:text=solium%20taeniasis%20is%20acquired%20by,also%20become%20infected%20with%20T\(12.09.2022\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis#:~:text=solium%20taeniasis%20is%20acquired%20by,also%20become%20infected%20with%20T(12.09.2022))
26. Zhao J.-L., Lerner A., Shu Z., Gao X.-J., Zee C.-S. Imaging spectrum of neurocysticercosis. *Radiol. Infect. Dis.* 2015, vol. 1, no. 2, pp. 94–102. doi: 10.1016/j.jrid.2014.12.001

Авторы:

Шинь Ц.Т., доцент, врач отделения внутренних болезней больницы Медицинского университета Винь, Нгеан, Вьетнам;
Тханг Ч.Т., врач департамента медицинской экспертизы Глазной больницы Нгеан, Нгеан, Вьетнам;
Тханг Т.Д., врач отделения внутренних болезней Больницы Тхай Тхыонг Хоанг, Нгеан, Вьетнам;
Лой К.Б., доцент, врач, отдел научного менеджмента и обучения Национального института малярии, паразитологии и энтомологии, Ханой, Вьетнам;
Ань Л.Ч., доцент кафедры паразитологии Вьетнамского военно-медицинского университета, Ханой, Вьетнам.

Authors:

Sinh C.T., Associate Professor, MD, PhD, Department of Internal medicine, Vinh Medical University Hospital, Vinh Medical University, Nghe An, Vietnam;
Thang T.T., Department of Medical examination, Nghe An Eye Hospital, Nghe An, Vietnam;
Thang T.D., MD, Department of Internal medicine, Thai Thuong Hoang Hospital, Nghe An, Vietnam;
Loi C.B., Associate Professor, MD, PhD, Scientific and Training Management Department, National Institute of Malaria, Parasitology and Entomology, Ha Noi, Vietnam;
Anh L.T., Associate Professor, MD, PhD, Department of Parasitology, Vietnam Military Medical University, Ha Noi, Vietnam.

Поступила в редакцию 24.03.2022
 Отправлена на доработку 20.04.2022
 Принята к печати 11.09.2022

Received 24.03.2022
 Revision received 20.04.2022
 Accepted 11.09.2022

ОЦЕНКА ВНЕДРЕНИЯ ПРОГРАММ ПРОФИЛАКТИКИ И ИНФЕКЦИОННОГО КОНТРОЛЯ В СТАЦИОНАРАХ АРМЕНИИ НА ФОНЕ ПАНДЕМИИ COVID-19

Г.О. Палозян, Ш.М. Аветисян, Р.А. Абовян, Г.Г. Мелик-Андреасян, А.В. Ванян

ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения

Резюме. Цель исследования: определить текущее состояние реализации в стационарах Армении ключевых аспектов профилактики инфекций и инфекционного контроля (ПИИК), определенных основными компонентами ВОЗ, с использованием инструмента опросника IPCAF (Infection Prevention and Control Assessment Framework). *Материалы и методы.* В исследование были включены все 113 стационаров страны. Все респонденты заполнили вопросник IPCAF, состоящий из 8 разделов (каждый оценивался максимально до 100 баллов), посвященных различным аспектам ПИИК. В зависимости от суммарной итоговой оценки программы ПИИК были разделены на следующие категории: продвинутая (601–800 баллов), средняя (401–600 баллов), базовая (201–400 баллов) и неадекватная (0–200 баллов). В ходе исследования был проведен описательный анализ общей оценки IPCAF, а также оценок соответствующих основных компонентов и некоторых отдельных вопросов, представляющих особый интерес. *Результаты.* Суммарная средняя оценка по всем компонентам IPCAF для всех стационаров Армении в 2021 г. составляет $578,0 \pm 7,9$ баллов, что на данный момент расценивается как «промежуточный» уровень. При этом 47 (41,6%) стационаров были отнесены к продвинутой, 63 (55,7%) — к средней и 3 (2,7%) — к базовой категории. Анализ по основным компонентам (СС, Core component) ПИИК выявил, что максимальные средние оценки были получены по компонентам СС2 (Руководство по ПИИК) — 80,8 баллов, СС8 (Создание безопасной среды в медицинских помещениях, а также материалы и оборудование для ПИИК) — 75,5 баллов и СС7 (Рабочая нагрузка, укомплектованность персоналом и количество койко-мест) — 75,2 балла. Наименьшие средние оценки были получены по ключевым компонентам: СС4 (Эпиднадзор за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи) — 54,7 баллов и СС3 (Образование и профессиональная подготовка по ПИИК) — 59,5 баллов. *Заключение.* Законодательные и практические изменения, осуществленные в реальной ситуации во время пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19), внесли значительный вклад в улучшение оценок по многим ключевым компонентам программ ПИИК. Исследование показало, что IPCAF является полезным инструментом для оценки стандартов ПИИК и выявления недостатков, независимо от уровня экономического развития страны. На наш взгляд следует поощрять повторное применение IPCAF во всех медицинских учреждениях, что имеет важное значение для наблюдения за изменениями и тенденциями в ПИИК, а также разработки индивидуальных стратегий в развитии и совершенствовании ПИИК.

Ключевые слова: профилактика инфекций, инфекционный контроль, оценка, стационар, вопросник, COVID-19, IPCAF.

Адрес для переписки:

Палозян Геннадий Овсепович
0025, Армения, Ереван, ул. Мхитара Гераци, 12,
Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний.
Тел.: +37412 80-80-83, 80-90-16 (служебн.); +374 94 22-56-10 (моб.).
E-mail: ncdc.palozyan@gmail.com

Contacts:

Gennady H. Palozyan
0025, Armenia, Yerevan, Mkhitar Heratsi str., 12,
National Center of Disease Control and Prevention.
Phone: +37412 80-80-83, 80-90-16 (office); +374 94 22-56-10 (mobile).
E-mail: ncdc.palozyan@gmail.com

Для цитирования:

Палозян Г.О., Аветисян Ш.М., Абовян Р.А., Мелик-Андреасян Г.Г., Ванян А.В. Оценка внедрения программ профилактики и инфекционного контроля в стационарах Армении на фоне пандемии COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1149–1155. doi: 10.15789/2220-7619-AIO-2044

Citation:

Palozyan G.H., Avetisyan Sh.M., Abovyan R.A., Melik-Andreasyan G.G., Vanyan A.V. Assessing implementation of prevention and infection control programs in armenian hospitals during the COVID-19 pandemic // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1149–1155. doi: 10.15789/2220-7619-AIO-2044

ASSESSING IMPLEMENTATION OF PREVENTION AND INFECTION CONTROL PROGRAMS IN ARMENIAN HOSPITALS DURING THE COVID-19 PANDEMIC

Palozyan G.H., Avetisyan Sh.M., Abovyan R.A., Melik-Andreasyan G.G., Vanyan A.V.

National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Erevan, Armenia

Abstract. Aim of the study was to assess the current state of implementing key aspects of infection prevention and control (IPC) in Armenian hospitals, defined by the main WHO components, using the survey tool IPCAF (Infection Prevention and Control Assessment Framework). *Materials and methods.* 113 hospitals were involved in the study. All participants filled out the IPCAF questionnaire, consisting of 8 sections (each rated up to 100 points) devoted to various IPC aspects. Depending on the total final score, IPC programs were divided into the following categories: advanced (601–800 points), intermediate (401–600 points), basic (201–400 points) and inadequate (0–200 points). The study conducted a descriptive analysis of the overall IPCAF score as well as score evaluation of the relevant core components and some selected questions of particular interest. *Results.* The 2021 total average score for all IPCAF components for all hospitals in Armenia is 578.0 ± 7.9 points, which is currently regarded as an “intermediate” level. At the same time, 47 (41.6%) hospitals were assigned to the advanced category, 63 (55.7%) — to the average category and 3 (2.7%) — to the basic category. Analysis of the main IPC components (CC, Core component) revealed that the maximum average scores were obtained for the components CC2 (IPC Guidelines) — 80.8 points, CC8 (Creating a safe environment in medical premises, as well as materials and equipment for IPC) — 75.5 points and CC7 (Workload, staffing and number of beds) — 75.2 points. The lowest average scores were obtained for the key components: CC4 (Surveillance for healthcare-associated infections) with 54.7 points and CC3 (IPC education and training) with 59.5 points. *Conclusion.* Legislative and practical changes implemented in the real world during the novel coronavirus infection (COVID-19) pandemic have significantly contributed to improved scores for many key components of IPC programs. The study found that the IPCAF is a useful tool for assessing IPC standards and identifying gaps, regardless of a country economic development level. In our opinion, the re-use of IPCAF in all medical institutions should be encouraged, which is important for monitoring changes and trends in IPC, as well as proposing individual strategies in the development and improvement of IPC.

Key words: infection prevention, infection control, evaluation, hospital, questionnaire, COVID-19, IPCAF.

Введение

Неадекватная практика профилактики и инфекционного контроля (ПИИК) в медицинских учреждениях является основной причиной роста показателей устойчивости к противомикробным препаратам (УПП) и инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [8, 9, 14]. Это обуславливает важность данной проблемы для общественного здравоохранения во всем мире [15]. Тем не менее значительная часть ИСМП поддается профилактике, а также появляется все больше доказательств, помогающих повысить осведомленность о глобальном бремени вреда, причиняемого этими инфекциями [7, 16], включая стратегии по сокращению их распространения [17].

В качестве одного из своих ключевых документов по усилению аспектов ПИИК ВОЗ выпустила «Руководство по основным компонентам программ профилактики и контроля инфекций» [19], предлагающее странам, а также отдельным учреждениям здравоохранения рекомендации по созданию и укреплению деятельности в сфере ПИИК. На уровне учреждения ВОЗ различает восемь основных компонентов (core component — CC), которые касаются различных аспектов ПИИК. Это:

- программы профилактики инфекций и инфекционного контроля (CC1);

- руководство по профилактике инфекций и инфекционному контролю на национальном уровне и уровне учреждений здравоохранения (CC2);

- образование и профессиональная подготовка по профилактике инфекций и инфекционному контролю (CC3);

- эпиднадзор за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (CC4);

- мультимодальные стратегии для осуществления мероприятий по профилактике инфекций и инфекционному контролю (CC5);

- мониторинг/проверка практической деятельности в области ПИИК, а также обратная связь и контроль (CC6);

- рабочая нагрузка, укомплектованность персоналом и количество койко-мест на уровне учреждения (CC7);

- создание безопасной среды в медицинских помещениях, а также материалы и оборудование для ПИИК на уровне учреждения (CC8).

Реализация ключевых аспектов ПИИК сильно различается не только между странами с разным уровнем доходов, но и внутри самих стран [11, 12, 13, 18], что особенно проявляется при оценке, проводимой на уровне отдельных учреждений. В качестве дополнительного инструмента для оценки, анализа и улучшения деятельности по ПИИК в каждом конкретном случае, ВОЗ недавно разработала и предоставила медицинским учреждениям документ в форме

вопросника «Механизм оценки профилактики и контроля инфекций» (IPCAF) [20], с помощью которого каждое учреждение, отвечая на вопросы, касающиеся ПИИК, самостоятельно может определить сильные и слабые стороны.

Различные исследования, проведенные в Армении, показали, что передача ИСМП, а также внедрение ПИИК представляют собой серьезную проблему [4].

В 2019 г. во всех стационарах Армении была проведена первая пилотная оценка внедрения ПИИК, которая выявила проблемы со внедрением практически всех основных компонентов программ ПИИК [3]. Национальная команда по ПИИК провела большую работу по совершенствованию нормативно-правовой базы, а также оказала методическую помощь учреждениям здравоохранения различного уровня по активному внедрению руководств и нормативно-правовых актов, касающихся различных аспектов ПИИК. Коронавирусная пандемия внесла свои коррективы во всем мире и потребовала усиления внимания к данным программам. В связи с этим целью нашей работы было описать текущее состояние реализации в стационарах Армении ключевых аспектов ПИИК, определенных основными компонентами ВОЗ, с использованием инструмента опросника IPCAF.

Материалы и методы

В ГНО «Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний» МЗ РА IPCAF-опросник был переведен на армянский язык и разослан во все 113 стационаров Армении. Результаты опроса были занесены в электронную базу данных в MS Excel.

Каждый возможный ответ на вопрос был оценен в баллах. Следуя концепции восьми основных компонентов ПИИК, IPCAF был разделен на восемь разделов. Для каждого основного компонента баллы по отдельным вопросам были суммированы. Максимальная оценка за каждый основной компонент составляет 100 баллов. Окончательная оценка IPCAF была рассчитана путем сложения оценок всех восьми основных компонентов (то есть максимально возможное общее количество баллов составляло 800). В зависимости от итоговой оценки стационары были сгруппированы в четыре разные категории IPC:

- 0–200 баллов: неадекватная;
- 201–400 баллов: основная (базовая);
- 401–600 баллов: средняя;
- 601–800 баллов: продвинутая.

Был проведен описательный анализ общей оценки IPCAF, а также оценок соответствующих основных компонентов и некоторых отдельных вопросов, представляющих особый интерес.

Статистический анализ данных проведен с использованием программного пакета MS Excel.

Результаты

Распределение стационаров Армении в зависимости от набранной суммарной оценки по всем основным компонентам ПИИК, представленное на рис. 1, показало, что почти все стационары Армении имеют среднепродвинутый уровень ПИИК.

Анализ по основным компонентам ПИИК выявил следующие особенности (рис. 2).

Ключевой компонент 1

Средняя оценка по ключевому компоненту 1 для всех стационаров Армении составляет 68,6 баллов (рис. 2).

Вследствие принятых во время пандемии COVID-19 законодательных мер все стационары Армении в 2021 г. имели программы ПИИК. Тем не менее с национальной командой, ответственной за ПИИК, сотрудничали лишь 92 стационара. Одной из ключевых причин данного факта послужило отсутствие в стационарах достаточного количества специалистов, прошедших обучение и переподготовку в области ПИИК. Такие специалисты работают лишь в 39 стационарах. Созданный при стационарах совет по ПИИК, включающий всех рекомендованных Приказом МЗ РА № 2117-А от 04.06.2021 г. [1] специалистов (представители администрации, зав. отделениями, старшие медсестры и другие) имеется только в 82 стационарах.

Лишь 68 стационаров в своих ПИИК, кроме основных целей, указали также показатели, измеряемые в числах. Сформулированный для ПИИК бюджет имеют лишь 74 стационара.

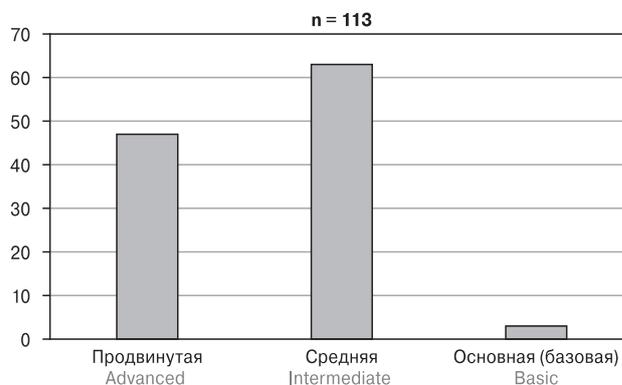


Рисунок 1. Распределение стационаров Армении в зависимости от суммарной оценки ПИИК в 2021 г.

Figure 1. 2021 Distribution of Armenian hospitals based on total IPCAF score

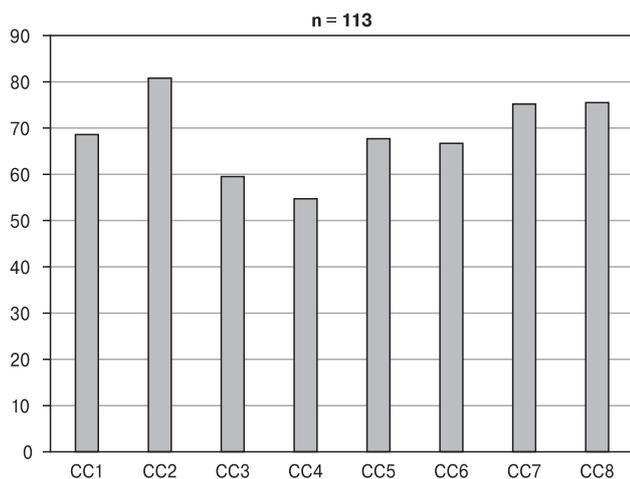


Рисунок 2. Средние значения оценок по основным компонентам ПИИК в стационарах Армении в 2021 г.

Figure 2. 2021 Average scores for IPCAF core components in Armenian hospitals

Одной из главных проблем ключевого компонента 1 для большинства стационаров Армении остается отсутствие у них собственной бактериологической лаборатории. При этом из 39 стационаров, имеющих таковую, только 35 доверяют результатам собственной лаборатории.

Ключевой компонент 2

Средняя оценка для всех стационаров Армении по ключевому компоненту 2 является максимальной среди всех ключевых компонентов ПИИК и составляет 80,8 баллов (рис. 2).

Только 79 стационаров имеют группу специалистов в области ПИИК, ответственную за разработку или адаптацию различных методических документов. При этом, если методические указания по дезинфекции и стерилизации, по гигиене рук использовали почти все учреждения, то число стационаров, внедривших другие методические рекомендации, в частности касающихся нозокомиальных пневмоний (56 стационаров), профилактики распространения полирезистентных штаммов бактерий (59 стационаров), рационального применения антибиотиков (69 стационаров), было ниже.

Следует также отметить, что все новые методические указания и руководства в сфере ПИИК, разработанные национальной командой и утвержденные Приказами МЗ РА, в обязательном порядке доводятся до сведения персонала всех стационаров, независимо от их правовой формы и ведомственного подчинения.

Ключевой компонент 3

Средняя оценка по ключевому компоненту 3 для всех стационаров Армении составляет 59,5 баллов (рис. 2).

Достаточное количество специалистов, способных и осуществляющих переподготовку сотрудников своих же стационаров в области ПИИК, имеют лишь 94 стационара. Причем только 66 стационаров делают это на регулярной основе для всего персонала, в то время как остальные стационары основное внимание уделяют лишь новым и недавно принятым на работу сотрудникам.

Основными способами обучения персонала являются письменная информация и устные сообщения. Интерактивное обучение на рабочих местах практикуется лишь в 23 стационарах.

Периодическая оценка эффективности учебных программ осуществляется только в 74 стационарах, в остальных же это проводится нерегулярно.

Большинство стационаров при заполнении вопросника обратили внимание на очень низкий уровень освещения вопросов ПИИК во время повышения квалификации и клинической практики специалистов различного профиля. Мало уделяется внимания также просвещению самих пациентов и лиц, осуществляющих за ними уход. Данная практика применяется лишь в 25 стационарах.

Ключевой компонент 4

Средняя оценка по ключевому компоненту 4 для всех стационаров Армении составляет 54,7 баллов и является самой низкой среди оценок для всех ключевых компонентов (рис. 2).

В соответствии с Приказом МЗ РА № 2117-А от 04.06.2021 г. [16], эпиднадзор является одним из ключевых компонентов программ ПИИК. В соответствии с вышеуказанным, в стационарах назначены ответственные лица. Однако соответствующую переподготовку (обучение) по вопросам эпидемиологии, эпиднадзора и ПИИК, прошли только 89 из них. Современные информационные технологии, применяемые при осуществлении эпиднадзора, используются в 54 стационарах.

Эпиднадзор по отдельным видам ИСМП осуществляется в 41–78 стационарах. Самый высокий уровень надзора (в 91 стационаре) проводится по вирусным гепатитам В и С, а также по ВИЧ/СПИД, что связано с повсеместным введением тестирования на данные инфекции при поступлении в стационар (особенно с целью хирургического лечения).

98 стационаров регулярно проверяют соответствие системы эпиднадзора в учреждении реальным потребностям. Однако достоверные определения для случаев (числители и знаменатели), которые соответствуют международным критериям, применяются лишь в 28 стационарах. Стандартизированные методы сбора данных применяются лишь в 37 стационарах.

Алгоритмы для периодической проверки качества данных имеются лишь в 46 стационарах.

63 стационара не имеют достаточной укомплектованности бактериологической лаборатории для верификации патогенов и определения антимикробной устойчивости.

Данные эпиднадзора используются для улучшения процесса ПИИК лишь в 62 стационарах. Данные антибактериальной устойчивости на регулярной основе анализируются только в 42 стационарах. Регулярная система контроля и обратной связи осуществляется лишь в 75 стационарах.

Ключевой компонент 5

Средняя оценка для всех стационаров Армении по ключевому компоненту 5 составляет 67,7 баллов (рис. 2).

Несмотря на то что практически во всех стационарах при самооценке было указано на применение комплексных стратегий для осуществления мероприятий по ПИИК, данные стратегии в полноценном объеме осуществляются не везде. Так, полный объем мероприятий по изменению системы осуществляется в 34, по обучению персонала — в 44, по мониторингу и обратной связи — в 56, по коммуникациям и напоминаниям — в 37, а по охране окружающей среды и по изменению культуры — лишь в 33 стационарах.

При осуществлении комплексных стратегий принимает участие команда из специалистов разного профиля лишь в 88 стационарах. Данная стратегия включает в себя применение контрольной анкеты в 45 стационарах.

Ключевой компонент 6

Средняя оценка для всех стационаров Армении по ключевому компоненту 6 составляет 66,7 баллов (рис. 2).

Лишь 64 стационара имеют обученный персонал, ответственный за мониторинг/аудит и систему обратной связи в сфере ПИИК. Они имеют план мониторинга с четко зафиксированными целями, задачами и мероприятиями. В остальных стационарах данный план осуществляется лишь частично. Особенно плохо обстоят дела в области мероприятий по профилактике распространения полирезистентных микроорганизмов. Самооценка гигиены рук в соответствии с инструментом ВОЗ осуществляется лишь в 45 стационарах.

Система обратной связи при аудите эффективности ПИИК в 24 стационарах вообще не осуществляется, лишь в 16–48 стационарах данная система осуществляется по отдельным аспектам. Результаты мониторинга регулярно доводятся до ответственных лиц в 80 стационарах.

Ключевой компонент 7

Средняя оценка для всех стационаров Армении по ключевому компоненту 7 составляет 75,2 балла (рис. 2).

Лишь в половине учреждений соотношение медперсонал/пациенты соответствовало рекомендациям ВОЗ. Почти во всех стационарах планировка палат соответствует международным стандартам, хоть и не во всех отделениях.

В 90% стационаров было отмечено, что поддерживается правило «1 пациент на 1 койку», при этом в 96% учреждений было указано, что койки практически никогда не устанавливаются вне палат. В 96,5% стационаров соблюдается минимальное расстояние между койками — не менее 1 м.

Ключевой компонент 8

Средняя оценка для всех стационаров Армении по ключевому компоненту 8 составляет 75,5 баллов (рис. 2).

85% стационаров имеют круглосуточное бесперебойное водоснабжение, а 13,3% — не менее 5 дней в неделю. В 94,7% стационаров количество санузлов соответствует требуемому соотношению к числу коек, но в 21 (18,6%) стационаре не все из них функционируют. Следует также отметить, что лишь в 78 (69%) стационарах санузлы обеспечены всеми необходимыми санитарными принадлежностями (дезинфекционные средства, вода, одноразовые салфетки).

В 56 стационарах имеются одноместные палаты, а в 46 — палаты, которые могут быть приспособлены для изоляции пациентов.

Несмотря на период пандемии, лишь в 79 стационарах ИСЗ для медперсонала доступны всегда и в достаточном количестве.

Правила обращения с медицинскими отходами, регламентированные Приказом МЗ РА № 03-Н от 04.03.2008 [17], соблюдаются в полной мере лишь в 81 стационаре.

В 76 стационарах имеется стерилизационное отделение, однако в 18 из них оно функционирует нерегулярно. При этом практически во всех стационарах отмечено постоянное обеспечение готовыми стерильными принадлежностями (хоть и в недостаточном количестве).

Обсуждение

Наше исследование позволило получить ценную информацию о состоянии внедрения ключевых компонентов ПИИК в стационарах Армении. Суммарная средняя оценка по всем компонентам IPCAF в 2021 г. составляет $578,0 \pm 7,9$ баллов, что на данный момент расценивается как «промежуточный» уровень. Тем не менее это на 34,4% превышает среднюю оценку по стране по состоянию до пандемии (2019 г.) [3].

В целом установлено что ИРС еще недостаточно адекватно рассматривается в некоторых учреждениях, а наличие в стационарах Армении программ ПИИК не имеет прямого отношения к хорошо функционирующей системе ПИИК на уровне данного учреждения. В частности, мы обнаружили явные различия между агрегированными баллами соответствующих разделов ИРСАФ.

В целом структуры и процессы ПИИК в Армении находятся пока еще на уровне выше среднего, особенно в отношении руководящих принципов ПИИК и некоторых аспектов эпиднадзора за ИСМП. Изменения, внедренные в реальную ситуацию во время пандемии коронавирусной инфекции, внесли значительный вклад в улучшение оценок по многим ключевым компонентам программ ПИИК. В частности, потенциалы для улучшения были замечены: в отношении мультимодальных стратегий для реализации вмешательств по ПИИК, обучения и подготовки по ПИИК, укомплектования штатов специалистами по ПИИК и других работников здравоохранения, а также привлечения соответствующих заинтересованных сторон. Сравнение с данными национальных исследований с использованием ИРСАФ, про-

веденных в соседних, а также в экономически развитых странах, выявило много общего. Общее внедрение структур и процессов ПИИК в Армении оказалось на несколько более высоком уровне, чем в соседней Грузии [10], но на более низком уровне, чем в Германии [6], хотя по некоторым показателям почти доходило до уровня Австрии [5]. Подобно опросам, проведенным в указанных странах, данные, собранные в стационарах Армении, показали, что ИРСАФ является полезным инструментом для оценки стандартов ПИИК и выявления недостатков, независимо от уровня экономического развития страны. На наш взгляд, следует поощрять повторное применение ИРСАФ во всех медицинских учреждениях, что имеет важное значение для наблюдения за изменениями и тенденциями в ПИИК, а также разработки индивидуальных стратегий в развитии и совершенствовании ПИИК.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность администрации и госпитальным эпидемиологам всех стационаров за отзывчивость и помощь в заполнении вопросника.

Список литературы/References

1. Об утверждении методического руководства «Основные компоненты профилактики инфекций и инфекционного контроля в медицинских учреждениях», типовой программы профилактики инфекций и инфекционного контроля в медицинских учреждениях, учреждениях здравоохранения первичного звена и стоматологических учреждениях»: Приказ МЗ РА № 2117-А от 04.06.2021 года. [On approval of the methodological guide “The main components of infection prevention and infection control in medical institutions», the model program of infection prevention and infection control in medical institutions, primary health care institutions, and dental institutions”]: Order of the Minister of Health of the Republic of Armenia No. 2117-A (04.06.2021)]
2. Об утверждении санитарных норм и правил № 2.1.3-3 «Гигиенические и противоэпидемические требования, предъявляемые к обращению медицинских отходов»: Приказ МЗ РА № 03-Н от 04.03.2008 года. [On approval of sanitary norms and rules № 2.1.3-3 “Hygienic and anti-epidemic requirements for the treatment of medical waste”]: Order of the Minister of Health of the Republic of Armenia No. 03-N (04.03.2008)]
3. Палозян Г.О. Оценка программ профилактики инфекций и инфекционного контроля в стационарах Армении в 2019 году с помощью международного инструмента ИРСАФ // Медицинская наука Армении. 2022. № 4. [Palozyan G. Evaluation of IPC programs in Armenian hospitals in 2019 with IPCAF tool. *Meditsinskaya nauka Armenii = Medical Science of Armenia*, 2022, no. 4. (In Russ.)]
4. Палозян Г.О., Аветисян Ш.М., Абовян Р.А., Мелик-Андреасян Г.Г., Ванян А.В. Оценка программ профилактики инфекций и инфекционного контроля в стационарах Армении в 2019–2021 гг. // Материалы V съезда эпидемиологов, медицинских микробиологов и паразитологов Армении (с международным участием). Ереван, 2022. С. 90–94. [Palozyan G., Avetisyan Sh., Abovyan R., Melik-Andreasyan G., Vanyan A. Evaluation of IPC programs in Armenian hospitals in 2019–2021. Materials of 5th Congress of epidemiologists, medical microbiologists and parasitologists of Armenia (with international participation). *Yerevan*, 2022, pp. 90–94.]
5. Aghdassi S.J.S., Grisold A., Wechsler-Fördös A., Hansen S., Bischoff P., Behnke M., Gastmeier P. Evaluating infection prevention and control programs in Austrian acute care hospitals using the WHO Infection Prevention and Control Assessment Framework. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 2020, vol. 9, no. 1: 92. doi: 10.1186/s13756-020-00761-2
6. Aghdassi S.J.S., Hansen S., Bischoff P., Behnke M., Gastmeier P. A national survey on the implementation of key infection prevention and control structures in German hospitals: results from 736 hospitals conducting the WHO Infection Prevention and Control Assessment Framework (IPCAF). *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 2019, vol. 8: 73. doi: 10.1186/s13756-019-0532-4
7. Allegranzi B., Bagheri Nejad S., Combescure C., Graafmans W., Attar H., Donaldson L., Pittet D. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 2011, vol. 377, no. 9761, pp. 228–241. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61458-4
8. Alp E., Damani N. Healthcare-associated infections in intensive care units: epidemiology and infection control in low-to-middle income countries. *J. Infect. Dev. Ctries*, 2015, vol. 9, no. 10, pp. 1040–1045. doi: 10.3855/jidc.6832

9. Cosgrove S.E. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin. Infect. Dis.*, 2006, vol. 42 (suppl. 2), pp. S82–S89. doi: 10.1086/499406
10. Deryabina A., Lyman M., Yee D., Gelieshvilli M., Sanodze L., Madzgarashvili L., Weiss J., Kilpatrick C., Rabkin M., Skaggs B., Kolwaite A. Core components of infection prevention and control programs at the facility level in Georgia: key challenges and opportunities. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 2021, vol. 10, no. 1: 39. doi: 10.1186/s13756-020-00879-3
11. Dickstein Y., Nir-Paz R., Pulcini C., Cookson B., Beović B., Tacconelli E., Nathwani D., Vatcheva-Dobrevska R., Rodríguez-Baño J., Hell M., Saenz H., Leibovici L., Paul M. Staffing for infectious diseases, clinical microbiology and infection control in hospitals in 2015: results of an ESCMID member survey. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2016, vol. 22, no. 9, pp. 812.e9–812.e17. doi: 10.1016/j.cmi.2016.06.014
12. Hansen S., Schwab F., Gropmann A., Behnke M., Gastmeier P., Consortium P. Hygiene und Sicherheitskultur in deutschen Krankenhäusern. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*, 2016, vol. 59, no. 7, pp. 908–915.
13. Hansen S., Zingg W., Ahmad R., Kyratsis Y., Behnke M., Schwab F., Pittet D., Gastmeier P.; PROHIBIT study group. Organization of infection control in European hospitals. *J. Hosp. Infect.*, 2015, vol. 91, no. 4, pp. 338–345. doi: 10.1016/j.jhin.2015.07.011
14. Laxminarayan R., Duse A., Wattal C., Zaidi A.K., Wertheim H.F., Sumpradit N., Vlieghe E., Hara G.L., Gould I.M., Goossens H., Greko C., So A.D., Bigdeli M., Tomson G., Woodhouse W., Ombaka E., Peralta A.Q., Qamar F.N., Mir F., Kariuki S., Bhutta Z.A., Coates A., Bergstrom R., Wright G.D., Brown E.D., Cars O. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.*, 2013, vol. 13, no. 12, pp. 1057–1098. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9
15. Mehrad B., Clark N.M., Zhanel G.G., Lynch J.P. 3rd. Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. *Chest*, 2015, vol. 147, no. 5, pp. 1413–1421. doi: 10.1378/chest.14-2171
16. Report on the endemic burden of healthcare-associated infection worldwide. Geneva: World Health Organization, 2011. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/am/10665/80135/1/9789241501507_eng.pdf (18.08.2021)
17. Shekelle P.G., Pronovost P.J., Wachter R.M., McDonald K.M., Schoelles K., Dy S.M., Shojania K., Reston J.T., Adams A.S., Angood P.B., Bates D.W., Bickman L., Carayon P., Donaldson L., Duan N., Farley D.O., Greenhalgh T., Haughom J.L., Lake E., Lilford R., Lohr K.N., Meyer G.S., Miller M.R., Neuhauser D.V., Ryan G., Saint S., Shortell S.M., Stevens D.P., Walshe K. The top patient safety strategies that can be encouraged for adoption now. *Ann. Intern. Med.*, 2013, vol. 158, no. 5, pt 2, pp. 365–368. doi: 10.7326/0003-4819-158-5-201303051-00001
18. Struelens M.J., Wagner D., Bruce J., MacKenzie F.M., Cookson B.D., Voss A., van den Broek P.J., Gould I.M.; ARPAC Steering Group. Status of infection control policies and organisation in European hospitals, 2001: the ARPAC study. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2006, vol. 12, no. 8, pp. 729–737. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01462.x
19. WHO. Guidelines on Core components of Infection Prevention and Control Programmes at the national and acute health care facility level. World Health Organization, 2016. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/251730/9789241549929-eng.pdf?sequence=1> (27.02.2019)
20. WHO. Infection Prevention and Control Assessment Framework. World Health Organization, 2018. URL: <https://www.who.int/infection-prevention/tools/core-components/IPCAF-facility.pdf> (27.02.2019)

Авторы:

Палозян Г.О., врач-эпидемиолог отдела эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения;

Аветисян Ш.М., врач-эпидемиолог отдела эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения;

Абовян Р.А., начальник отдела эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения;

Мелик-Андреасян Г.Г., д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, филиал «Референс-лабораторный центр», Ереван, Армения;

Ванян А.В., к.м.н., генеральный директор ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения.

Authors:

Palozyan G.H., Epidemiologist, Department of Epidemiology of Communicable and Non-Communicable Diseases, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Yerevan, Armenia;

Avetisyan Sh.M., Epidemiologist, Department of Epidemiology of Communicable and Non-Communicable Diseases, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Yerevan, Armenia;

Abovyan R.A., Head of the Department of Epidemiology of Communicable and Non-Communicable Diseases, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Yerevan, Armenia;

Melik-Andreasyan G.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy-Director for Scientific Work, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, “Referens Laborator Center” Branch, Yerevan, Armenia;

Vanyan A.V., PhD (Medicine), General Director, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Yerevan, Armenia.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* nonO1/nonO139 — ВОЗБУДИТЕЛЯ НОВОГО СЛУЧАЯ ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ В РОСТОВЕ-НА-ДОНУ

Е.В. Монахова, В.Д. Кругликов, А.С. Водопьянов, Н.А. Селянская, М.И. Ежова,
А.К. Носков

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

Резюме. В Ростовской области России более 50 лет существует гетерогенная популяция холерных вибрионов nonO1/nonO139 (НАГ-вибрионов), представители которой периодически вызывают у людей острые кишечные инфекции; последний случай зарегистрирован в 2018 г., а в 2022 г. в Ростове был снова выявлен больной ребенок, от которого выделили 2 субкультуры НАГ-вибриона. Цель исследования: биоинформационный анализ полногеномных сиквенсов (WGSs) выделенного в 2022 г. клинического штамма НАГ-вибриона, генетических детерминант факторов патогенности и продуктов их трансляции *in silico*. *Материалы и методы.* Выделение, идентификацию культур, определение антибиотикочувствительности осуществляли согласно МУК 4.2.3745-22, SNP-анализ WGSs, полученных на платформе MiSeq Illumina, — с помощью авторского программного обеспечения, для идентификации и анализа генов и продуктов их трансляции использовали программы BioEdit 7.2.5, Vector NTI Advance 11, базу данных CARD. *Результаты.* Выделенные культуры, идентичные по фенотипическим признакам и ПЦР-генотипам, результатам SNP-анализа, были идентифицированы как нетоксигенный НАГ-вибрион. Возбудитель проявлял чувствительность к левомицетину, цефтриаксону, стрептомицину, гентамицину, налидиксовой кислоте, ципрофлоксацину, ампициллину, амикацину и промежуточную устойчивость к тетрациклину, доксициклину, фуразолидону, ко-тримоксазолу. В WGSs отсутствовали профаги CTX, *preCTX*, остров патогенности VPI, гены термостабильного и *cholix*-токсинов, острова пандемичности VSP-I и VSP-II. Детерминанты системы секреции б типа (T6SS) были представлены не в полном составе, что свидетельствовало в пользу утраты ее функциональности. Выявлен интактный кластер T3SS, к которому прилежала область *nan-nag* острова патогенности VPI-2 при отсутствии проксимальной и дистальной частей последнего. Обнаружены кластер RTX, ответственный за синтез цитотоксина MARTX, гены гемолизина HlyA, цитотонического токсина Cef, нескольких сериновых и металлопротеаз. Большинство детерминант отличались по нуклеотидному составу от прототипов, но их продукты сохраняли характерные активные домены. Адгезивную активность могли обеспечивать не чувствительные к маннозе MSHA-подобные пили, поскольку *msh*-кластер содержал все необходимые для их продукции гены, а также жгутики, оба ответственных

Адрес для переписки:

Монахова Елена Владимировна
344002, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40,
Ростовский-на-Дону научно-исследовательский
противочумный институт.
Тел.: 8 (863) 240-91-33.
E-mail: monakhova_ev@antiplague.ru

Contacts:

Elena V. Monakhova
344002, Russian Federation, Rostov-on-Don, M. Gorkogo str., 117/40,
Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute.
Phone: +7 (863) 240-91-33.
E-mail: monakhova_ev@antiplague.ru

Для цитирования:

Монахова Е.В., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Селянская Н.А.,
Ежова М.И., Носков А.К. Молекулярно-генетическая характеристика
штамма *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 — возбудителя нового
случая острой кишечной инфекции в Ростове-на-Дону // Инфекция
и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1156–1162. doi: 10.15789/2220-7619-
MGC-2022

Citation:

Monakhova E.V., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Selyanskaya N.A.,
Ezhova M.I., Noskov A.K. Molecular genetic characteristics of *Vibrio cholerae*
nonO1/nonO139 strain, the causative agent of a new case of acute intestinal
infection in Rostov-on-Don // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1156–1162. doi: 10.15789/2220-
7619-MGC-2022

за их образование кластера были на 99% идентичны прототипу. Из детерминант антибиотикорезистентности выявлен только ген β -лактамазы VarG. **Заключение.** Исследуемый штамм НАГ-вибриона содержит достаточное количество интактных детерминант факторов патогенности, экспрессия которых могла внести свой вклад в развитие заболевания.

Ключевые слова: холерные вибрионы неO1/неO139 (НАГ-вибрионы), острые кишечные инфекции, факторы патогенности, антибиотикочувствительность, полногеномное секвенирование, биоинформационный анализ.

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF *VIBRIO CHOLERAE* nonO1/nonO139 STRAIN, THE CAUSATIVE AGENT OF A NEW CASE OF ACUTE INTESTINAL INFECTION IN ROSTOV-ON-DON

Monakhova E.V., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Selyanskaya N.A., Ezhova M.I., Noskov A.K.

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. During more than 50 years, a heterogeneous population of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 (NAGs) exists in Rostov region of Russia, whose representatives periodically cause acute human intestinal infections; the last case was registered in 2018. In 2022, a sick child was again revealed in Rostov, from whom 2 NAG subcultures were isolated. Aim of the study: bioinformatics analysis of whole genome sequences (WGSs) of the 2022 clinical NAG isolates, genetic determinants of pathogenicity factors and relevant products. **Materials and methods.** Isolation, identification of cultures, as well as antibiotic sensitivity were carried out according to the MUK 4.2.3745-22. SNP analysis of WGSs obtained on the MiSeq Illumina platform were analyzed by means of designed software; BioEdit 7.2.5, Vector NTI Advance 11 package, CARD database were used to identify and analyze genes and relevant deduced products. **Results.** The isolated cultures with identical phenotypic features, PCR-genotypes and results of SNP analysis, were identified as a non-toxigenic NAG. The agent showed sensitivity to chloramphenicol, ceftriaxone, streptomycin, gentamicin, nalidixic acid, ciprofloxacin, ampicillin, amikacin and intermediate resistance to tetracycline, doxycycline, furazolidon and co-trimoxazole. WGSs lacked CTX and preCTX prophages, pathogenicity island VPI, thermostable and cholix toxin genes, pandemic islands VSP-I and VSP-II. The determinants of the type 6 secretion system (T6SS) were not presented completely, which evidenced in favor of the loss of its functionality. An intact T3SS cluster was revealed, which was adjacent to the *nan-nag* region of the VPI-2 pathogenicity island in the absence of the proximal and distal parts of the latter. Other determinants of pathogenicity factors were revealed: RTX cluster responsible for synthesis of MARTX cytotoxin, genes for hemolysin HlyA, cytotoxic toxin Cef, several serine and metalloproteases. The nucleotide compositions of most determinants differed from the prototypes, but their putative products preserved characteristic active domains. The adhesive activity might be provided by mannose-insensitive MSHA-like pili, since the *msh*-cluster included all the genes necessary for their production, as well as flagella, as both clusters responsible for their assembling were 99% identical to the prototype. From antibiotic resistance determinants only β -lactamase VarG gene was found. **Conclusion.** The NAG strain examined here contains a sufficient set of intact virulence-associated genetic determinants, expression of which could contribute to the development of the disease.

Key words: *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 (NAGs), acute intestinal infections, pathogenicity factors, antibiotic susceptibility, whole genome sequencing, bioinformatics analysis.

Введение

Как известно, холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп (НАГ-вибрионы) являются естественными обитателями поверхностных водоемов и в большинстве своем не содержат генетических детерминант ключевых факторов патогенности *Vibrio cholerae* — холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей (ТСП). Они не склонны к эпидемическому распространению, но в определенных условиях могут выступать в роли этиологических агентов спорадических случаев и даже локальных вспышек острых кишечных инфекций (ОКИ), реже — внекишечных форм заболеваний [7]. В Ростовской области Российской Федерации (РФ) более 50 лет (с конца 1960-х гг.) существует довольно гетерогенная популяция НАГ-вибрионов, представители которой периодически, с перерывами от 1 до 4 лет, вызывают у людей ОКИ [1, 2], хотя

из водоемов выделяются постоянно. Последний больной был выявлен в области в 2018 г., после чего (в период пандемии COVID-19) клинические штаммы НАГ-вибрионов на территории России не регистрировались. Однако в июне 2022 г. в Ростове снова был выявлен больной ребенок, от которого были выделены две субкультуры НАГ-вибриона. Поскольку представители этой группы крайне гетерогенны по количественному и качественному составу детерминант факторов патогенности [7], представлял интерес вопрос о том, какие именно из них могли явиться причиной реализации возбудителем патогенетического потенциала.

Цель настоящего исследования состояла в биоинформационном анализе полногеномных сиквенсов выделенного в 2022 г. клинического штамма *V. cholerae* nonO1/nonO139, генетических детерминант факторов патогенности и продуктов их трансляции.

Материалы и методы

Объектами исследования служили 2 штамма *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенные от одного и того же больного ребенка с интервалом в 3 дня.

Штаммы идентифицировали бактериологическим методом и в ПЦР в режиме реального времени в соответствии с МУК 4.2.3745-22 [6] с использованием набора «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL» (Регистр. удостоверение № ФСР 2011/11139). Чувствительность к антибиотикам определяли согласно этим же методическим указаниям [6].

Полногеномное секвенирование на платформе MiSeq Illumina и SNP-анализ проводили как описано ранее [4]. Для идентификации в полных геномах (WGSs) отдельных генов и их кластеров использовали программу BioEdit 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit>), генетических детерминант лекарственной устойчивости — базу CARD (<https://card.mcmaster.ca>) и последовательности других найденных в NCBI генов, встречающихся у холерных вибрионов. Трансляцию генов, анализ их нуклеотидных последовательностей и аминокислотных (aa) последовательностей их продуктов осуществляли с использованием пакета программ Vector NTI Advance 11 (Invitrogen). Прототипами служили WGSs референс-штамма *V. cholerae* N16061 (AE003852, AE003853) и *V. cholerae* O37 AM-19226 (AATY0200000000). Для определения наличия и локализации активных доменов в белках выполняли BLASTP-анализ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Результаты и обсуждение

Выделение, идентификация и фенотипические свойства возбудителя

Больная N., 10 лет, жительница Ростова-на-Дону, была осмотрена на дому врачом скорой помощи, прибывшим 16.06.2022 г. по вызову в связи с жалобами ребенка на желудочно-кишечное расстройство, боль в животе и слабость, и поставлен предварительный диагноз «неуточненный гастроэнтерит и колит инфекционного происхождения». Помимо оральной регидратационной терапии был назначен препарат антибиотика амоксициллина. Из отобранного материала (feces) в Городской лаборатории клинической микробиологии на третий день был выделен штамм № 46, идентифицированный как нетоксигенный *V. cholerae* nonO1/nonO139. Он был передан в референс-центр по мониторингу за холерой (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора), где его видовая и серогрупповая принадлежность была подтверждена. Параллельно были переданы трехкратно повторно отобранные пробы клинического материала от этой же больной,

а также от контактного лица (матери девочки, 38 лет). В результате бактериологического исследования клинического материала от больной был выделен нетоксигенный штамм *V. cholerae* nonO1/nonO139 № 19, а в материале от матери НАГ-вибрионов обнаружено не было. На шестой день от начала заболевания в институт вновь поступили трехкратно отобранные пробы от больной, результат бактериологического исследования на наличие холерных вибрионов на этот раз оказался отрицательным. За ребенком проводилось ежедневное наблюдение в течение 7 дней, до полной нормализации состояния.

Выделенные культуры были идентичными по морфологическим и биохимическим признакам, характерным для вида *V. cholerae*, не агглютинировались сыворотками O1, Огава, Инаба, O139, RO. По результатам ПЦР они имели генотип *ctxA*⁻, *tcpA*⁻, *hly*⁺, *wbeO1*⁻, *wbf O139*⁻, что подтвердило их принадлежность к НАГ-вибрионам. Обе культуры проявляли чувствительность к левомицетину, цефтриаксону, стрептомицину, гентамицину, налидиксовой кислоте, ципрофлоксацину, ампициллину, амикацину и промежуточную устойчивость к тетрациклину, доксициклину, фуразолидону и ко-тримоксазолу.

Анализ генов и их продуктов

Результаты кластерного анализа по 3682 SNP (однонуклеотидные полиморфизмы) показали, что оба штамма, 46 и 19, были практически идентичными друг другу, различаясь всего по двум SNP. Это указывает на то, что заболевание было вызвано одним, а не двумя разными клонами.

Особый интерес представляло определение наличия и состояния генетических детерминант факторов патогенности, которые могли быть причастными к возникновению заболевания. С помощью программы BioEdit было подтверждено отсутствие генов холерного токсина *ctxAB* и всех остальных генов профага СТХ, кодирующих дополнительные факторы — адгезин Сер, токсины Ace и Zot, что также указывало и на отсутствие профага preСТХ, содержащего те же гены, кроме *ctxAB*. Остров патогенности VPI, в состав которого входит *tcp*-кластер, ответственный за продукцию TCP, также полностью отсутствовал. Не было обнаружено генов термостабильного токсина (*stn*), гемолизина TDH и TRH, cholix-токсина (*chxA*), а также островов пандемичности VSP-I и VSP-II. Вместе с тем в WGSs были идентифицированы детерминанты целого ряда факторов патогенности.

В первую очередь это кластер генов контактно-зависимой системы секреции 3 типа (Т3SS), способствующей колонизации кишечника, а на моделях лабораторных животных вызывающей тяжелую фатальную диарею [13]. Считается,

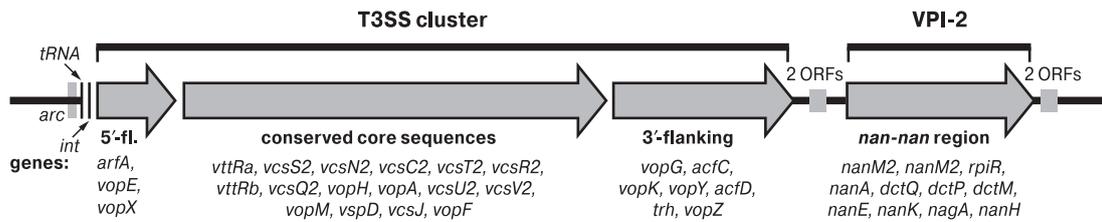


Рисунок 1. Схема участка генома штамма 46, включающего полный кластер T3SS и область *nan-nag* VPI-2

Figure 1. Scheme of the strain 46 genome fragment including the full T3SS cluster and the *nan-nag* region of VPI-2

Примечание. Перечислены только гены с известными функциями.

Note. Only genes with known functions are listed.

что T3SS⁺ штаммы более вирулентны, чем T3SS⁻ [15]. У штамма-возбудителя все гены структурных компонентов, эффекторов и регуляторов T3SS были интактными, хотя многие из них отличались от таковых «референс-штамма» AM-19226. Впрочем, этот штамм, у которого данная система секреции была обнаружена впервые, может считаться типовым лишь условно, поскольку кластер T3SS холерных вибрионов в значительной степени вариабелен по числу и структуре входящих в его состав генов, что можно наблюдать при анализе этого кластера в WGSs штаммов разных серогрупп, представленных в NCBI. Интересно, что сразу после последнего гена T3SS-кластера *vopZ* находились 2 неизвестные открытые рамки считывания (orf) длиной 1191 и 819 п.н., а за ними следовала группа из 11 генов, представляющая собой область *nan-nag* острова патогенности VPI-2, тогда как проксимальная и дистальная части этого острова полностью отсутствовали. Область *nan-nag* ответственна за утилизацию сиаловых кислот как источника углерода и обеспечение таким образом конкурентных преимуществ не только во внешней среде, но и в кишечнике [9]. Ранее аналогичная структура была выявлена Chen и соавт. [10] у штамма O31 серогруппы NRT36S. На рис. 1 показана схема фрагмента генома исследуемого штамма, включающая кластер T3SS (консервативный центральный коровый участок и 2 переменных, фланкирующих его с обеих сторон), и область *nan-nag*. Находящиеся между этими участками два гена не были найдены в имевшихся в нашем распоряжении WGSs T3SS-негативных штаммов НАГ-вибрионов, как и *V. cholerae* O1. Программа BLASTP идентифицировала их продукты как белки, содержащие Ig-подобный домен (Ig-like domain-containing protein), но этот и другие потенциальные домены находились в большем белке, а в меньшем отсутствовали. Как оказалось, у других T3SS⁺ штаммов O1 и неO1/неO139 серогрупп в этом месте находится один ген с такими же доменами, имеющий высокую степень гомологии с двумя

описанными, но у исследуемого штамма в результате вставки T-815 и сдвига рамки образовался преждевременный стоп-кодон, а ниже образовалась вторая, более короткая orf, но все домены остались в первой. Несмотря на присутствие потенциальных доменов, функции этого белка неизвестны, как и «история» попадания его гена в указанную позицию. То же можно сказать и о двух orf, следующих за *nanH* и не имеющих отношения к продолжению VPI-2 — первая (330 п.н.) кодирует белок с неизвестной функцией, вторая (807 п.н.) — белок, содержащий 2 домена — WYL и YafY, предположительно причастный к регуляции защитных систем микроорганизма и транскрипции.

Ген интегразы находился в начале кластера T3SS и отличался как от таковых других T3SS⁺ штаммов (WGSs которых были получены нами ранее либо найдены в NCBI), так и от прототипного гена интегразы VPI-2 (рис. 2), хотя обе эти интегразы имеют одинаковую длину 1236 п.н. и у типовых штаммов идентичны на 98%.

По всей видимости, приведенная на рис. 1 структура могла образоваться в результате обмена проксимального участка VPI-2 на кластер T3SS и утраты дистальной части VPI-2. Как и у других T3SS⁺ холерных вибрионов, кластер интегриро-

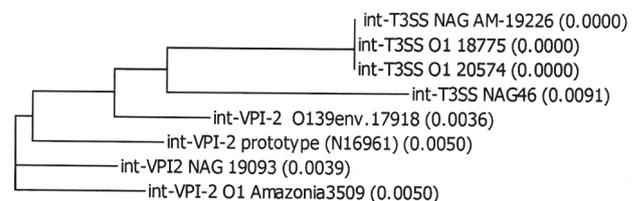


Рисунок 2. Дендрограмма, построенная по результатам AlignX-анализа генов интеграз, входящих в состав кластеров T3SS и VPI-2 разных штаммов *V. cholerae*

Figure 2. Dendrogram constructed based on the AlignX analysis data for integrase genes included in T3SS and VPI-2 clusters of various *V. cholerae* strains

ван в хромосому рядом с геном тРНК (еще один критерий мобильного генетического элемента), как и полный VPI-2 T3SS⁻ штаммов. Более того, перед геном тРНК в обоих случаях находится один и тот же ген транспортного белка семейства AcrB/D/F, что свидетельствует в пользу нашего предположения о генетическом обмене.

Что касается другой контакт-зависимой системы секреции — T6SS, то несмотря на присутствие основного кластера с генами структурных компонентов (*vipAB*, *hsiF*, *vasABCDEF*, *clpV*, *vasHIJKLM*) и эффектора *vgrG3*, продукт которого сохранил пептидогликан-связывающий домен PBD, способность к ее экспрессии исследуемым штаммом-возбудителем сомнительна. Во-первых, находящийся в этом кластере ген *vasK* усечен, следовательно, его продукт, крайне важный для секреции эффекторов [5], вряд ли является полноценным белком. Во-вторых, в геноме отсутствовали гены и самих эффекторов *vgrG1*, *vasX*, *tseL*, *tseH*, входящие в состав дополнительных кластеров AUX1, 2, 3 и 4; последние сохранили лишь гены структурных компонентов T6SS *hcp* и *vgrG2*.

Мощными факторами патогенности нетоксигенных штаммов принято считать высомолекулярный самопроцессирующий токсин-актиномодулятор MARTX и порообразующий растворимый гемолизин/цитолозин HlyA [7]. Кластер RTX содержал все необходимые для продукции MARTX гены (*rtxACBDE*, *chp*), а продукт трансляции гена собственно токсина *rtxA* имел такую же длину, что и прототип (4545 aa) и содержал все типичные активные домены (ACD, RID, ab/H, CPD) несмотря на то, что сам ген отличался от прототипа 419 мутациями (заменами от 1 до 4 нуклеотидов), большинство которых, правда, оказались молчащими. Ген гемолизина содержал 39 SNP, ни одна из которых также не привела к появлению преждевременного стоп-кодона. Фенотипически обе культуры были гемолитическими по отношению к бараньим эритроцитам.

Ген цитотонического токсина *cef* (CHO cell elongating factor) имел ту же длину, что и прототип, но отличался от него множеством SNPs. Тем не менее его продукт сохранил все характерные активные домены — Куница, лейциновую молнию, a/bH и LIP, а также субстрат-связывающий сайт GHSLG.

Гены металлопротеаз — гемагглютинин/протеазы НА/Р (*hapA*), коллагеназы VchC, входящей в состав *hly*-локуса протеазы PrtV, а также сериновых протеаз VesA, VesB, VesC, IvaP, RssP были интактными, хотя содержали большое число молчащих и миссенс-мутаций по сравнению с прототипами. Их продукты обеспечивают конкурентоспособность за белковые источники питания в разных экологи-

ческих нишах, однако многие из них одновременно могут быть факторами патогенности. В этом плане наиболее хорошо охарактеризовано актиномодулирующее действие НА/Р [3] и диареогенное — VesC [12].

Существенные отличия первичной структуры всех вышеперечисленных белков как от прототипа, так и от других штаммов НАГ-вибрионов, вероятно, оказывают влияние на их активность, усиливая ее либо ослабляя. Однако наличие большого числа интактных детерминант позволяет думать, что экспрессии хотя бы некоторых из них может быть достаточно для реализации патогенетического потенциала.

Способность вызвать ОКИ зависит не только от токсических субстанций, но от адгезивных свойств возбудителей, обеспечивающих колонизацию кишечника. Как отмечено выше, детерминанты ключевого фактора адгезии — пилей TSP и дополнительного — пилина Ser — в геноме отсутствовали. Однако в данном случае функцию фактора колонизации могли взять на себя MSHA-подобные пили. У токсигенных штаммов маннозочувствительные пили за счет механизмов регуляции экспрессируются только во внешней среде, играя роль фактора персистенции, но при попадании в организм человека их продукция репрессирована. Однако исследуемые штаммы, как и многие НАГ-вибрионы, содержали в составе *msh*-кластера измененные гены мажорной и минорной субъединиц этих пилей, ранее обозначенные нами как *mshA-like* и *mshC-like*. Нуклеотидные последовательности этих генов и, соответственно, aa-последовательности их продуктов у разных штаммов существенно различаются, консервативность сохраняют лишь проксимальные участки. MshA-like могут иметь разную длину, в нашем случае она составляла 148 aa, MshC-like чаще всего состоят из 170 aa. Такие пили являются «маннозонечувствительными», поэтому их продукция в кишечнике не подвержена репрессии. Как было установлено при изучении других клинических НАГ-вибрионов, обладающие ими штаммы сохраняют адгезивную активность по меньшей мере *in vitro* [11]. Адгезии также могли способствовать жгутики [14], так как оба ответственных за их образование кластера (*flaCA-flgLM* и *flaEGDB*) были на 99% идентичны прототипу.

Генов антибиотикорезистентности практически не обнаружено, что совпадало с чувствительностью к нескольким препаратам по фенотипу. В то же время программой CARD выявлен ген β-лактамазы *varG*, ответственной за устойчивость к пенициллинам, карбапенемам и цефалоспорином. Возможно, это отчасти повлияло на замедленную элиминацию возбудителя, поскольку ребенка лечили амоксицил-

лином — полусинтетическим антибиотиком группы пенициллинов, аналогом ампициллина. К ампициллину возбудитель был чувствителен и не содержал генов других β -лактамаз (*blaP1/carb2*, *carb7*, *carb9*, *blaVCC*), но мы не исключаем небольшой активности VarG по отношению к амоксициллину, хотя это предположение требует экспериментальной проверки. Что касается пониженной чувствительности к тетрациклину, ко-тримоксазолу и фуразолидону, то она могла быть результатом действия эффлюкс-помп, поскольку генов *tetA*, *tetR*, *dfrA/sul2* в геноме не выявлено, а причастность гена *nfsA*, гомолог которого (с 21 SNP) присутствовал, к резистентности к фуразолидону для холерных вибрионов не доказана. Штаммы НАГ-вибрионов с нулевой антибиотикорезистентностью выделялись от людей в Ростовской области и раньше, хотя в нынешнем столетии их число уменьшилось, также отмечалось повышение МПК тетрациклина [8]. Во всяком случае, выделенный в 2022 г. возбудитель не мог служить донором генов устойчивости для передачи другим штаммам популяции.

Заключение

Полученные результаты позволяют заключить, что исследуемый штамм НАГ-вибриона содержит достаточный набор детерминант фак-

торов патогенности, экспрессия которых могла внести свой вклад в развитие заболевания. Штаммы с аналогичными наборами встречались и раньше как на территории Ростовской области, так и в других регионах РФ [2]. В то же время все они различались по генотипам, и это касалось не только качественного и количественного состава генов и их кластеров, но и существования множества аллелей одних и тех же генов. Это связано с чрезвычайной пластичностью генома, превосходящей таковую нетоксигенных штаммов O1 серогруппы. В настоящее время, в отличие от прошлого столетия, НАГ-инфекции возникают у людей довольно редко и носят спорадический характер. Чаше они поражают детей, иммунная система которых еще полностью не сформирована, а также взрослых с ослабляющими иммунитет хроническими заболеваниями. НАГ-вибрионы постоянно присутствуют в окружающей среде и, возможно, персистируют в организме бессимптомных носителей. Их популяции в совокупности содержат еще более широкий спектр детерминант, что создает условия для процессов генетического обмена и формирования новых, возможно более вирулентных клонов, поэтому данная группа микроорганизмов заслуживает внимания при мониторинге холерных вибрионов на территории РФ, в том числе в плане дальнейшего изучения на уровне генома.

Список литературы/References

- Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Монахова Е.В., Непомнящая Н.Б., Подойницына О.А., Ежова М.И. Клинические штаммы холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп в России: динамика выделения, серологическая принадлежность, генетические особенности // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2021. Т. 11, № 1. С. 52–56. [Arkhangelskaya I.V., Kruglikov V.D., Levchenko D.A., Monakhova E.V., Nepomnyaschaya N.B., Podoinitsyna O.A., Ezhova M.I. Clinical strains of *Vibrio cholerae* nonO1/ nonO139 serogroups in Russia: isolation dynamics, serological belonging, genetic features. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, vol. 11, no. 1, pp. 52–54. (In Russ.)] doi: 10.18565/epidem.2021.11.1.52-6
- Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Кругликов В.Д. Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholerae* nonO1/non O139, циркулирующих в Ростовской области // Здоровье населения и среда обитания. 2015. № 3 (264). С. 25–28. [Arkhangelskaya I.V., Nepomnyaschaya N.B., Monakhova E.V., Vodopyanov A.S., Vodopyanov S.O., Kruglikov V.D. Genetic diversity of the population of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 circulating in Rostov region. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya = Public Health and Life Environment*, 2015, no. 3 (264), pp. 25–28. (In Russ.)]
- Бардахчян Э.А., Монахова Е.В., Харланова Н.Г., Саямов С.Р., Писанов Р.В. Ультраструктурные изменения тонкой кишки мышей-сосунков, вызванные действием гемагглютинин/протеазы холерных вибрионов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. Т. 145, № 4. С. 475–480. [Bardakchian E.A., Monakhova E.V., Kharlanova N.G., Sayamov S.R., Pisanov R.V. Ultrastructural changes in the small intestine of suckling mice, caused by *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease. *Byulleten' ekperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2008, vol. 145, no. 4, pp. 475–480. (In Russ.)]
- Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П., Кругликов В.Д., Титова С.В. Молекулярная эпидемиология *Vibrio cholerae* — разработка алгоритма анализа данных полногеномного секвенирования // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2016, № 3. С. 146–152. [Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Vodopyanov S.O., Mishankin B.N., Oleynikov I.P., Kruglikov V.D., Titova S.V. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* — development of the algorithm for data analysis of whole genome sequencing. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2016, vol. 21, no. 3, pp. 146–152. (In Russ.)] doi: 10.17816/EID40917
- Заднова С.П., Плеханов Н.А., Кульшань Т.А., Швиденко И.Г., Крицкий А.А. Система секреции шестого типа *Vibrio cholerae* // Проблемы особо опасных инфекций. 2022. № 2. С. 27–35. [Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Kul'shan' T.A., Shvidenko I.G., Kritsky A.A. *Vibrio cholerae* secretion system of the type VI. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2022, no. 2, pp. 27–35. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2022-2-27-35

6. Методы лабораторной диагностики холеры: Методические указания МУК 4.2.3745-22. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2022. [Methods of laboratory diagnosis of cholera: Guidelines MUK 4.2.2218-07. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rosпотребнадзор, 2022. (In Russ.)]
7. Монахова Е.В., Архангельская И.В. Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 2. С. 14–23. [Monakhova E.V., Arkhangelskaya I.V. Cholera vibrios of nonO1/nonO139 serogroups in etiology of acute intestinal infections: current situation in Russia and around the world. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2016, no. 2, pp. 14–23. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2016-2-14-23
8. Селянская Н.А., Веркина Л.М., Березняк Е.А., Титова С.В., Железняк Н.Г., Архангельская И.В. Сравнительная оценка антибиотикорезистентности штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенных от людей в Ростовской области в разные годы // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015. Т. 20, № 3. С. 32–35. [Selyanskaya N.A., Verkina L.M., Bereznayak E.A., Titova S.V., Zheleznyak N.G., Arkhangelskaya I.V. Comparative study of antibiotic resistance of *V. cholerae* nonO1/nonO139 strains isolated from humans in the Rostov region in various years. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2015, vol. 20, no. 3, pp. 32–35. (In Russ.)] doi: 10.17816/EID40875
9. Almagro-Moreno S., Boyd E.F. Sialic acid catabolism confers a competitive advantage to pathogenic *Vibrio cholerae* in the mouse intestine. *Infect. Immun.*, 2009, vol. 77, no. 9, pp. 3807–3816. doi: 10.1128/IAI.00279-09
10. Chen Y., Johnson J.A., Pusch G.D., Morris J.G. Jr., Stine O.C. The genome of non-O1 *Vibrio cholerae* NRT36S demonstrates the presence of pathogenic mechanisms that are distinct from those of O1 *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, no. 5, pp. 2645–2647. doi: 10.1128/IAI.01317-06
11. Monakhova E.V., Arkhangelskaya I.V., Titova S.V., Pisanov R.V. MSHA-like pili of non-toxigenic *Vibrio cholerae* strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2019, no. 3, pp. 52–57. doi: 10.21055/0370-1069-2019-3-75-80
12. Mondal A., Tapader R., Chatterjee N.S., Ghosh A., Sinha R., Koley H., Saha D.R., Chakrabarti M.K., Wai S.N., Pal A. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, 2016, vol. 84, no. 5, pp. 1478–1490. doi: 10.1128/IAI.01365-15
13. Shin O.S., Tam V.C., Suzuki M., Ritchie J.M., Bronson R.T., Waldor M.K., Mekalanos J.J. Type III secretion is essential for the rapidly fatal diarrheal disease caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae*. *mBio*, 2011, vol. 2, pp. e00106–e00111. doi: 10.1128/mBio.00106-11
14. Utada A.S., Bennett R.R., Fong J.C.N., Gibiansky M.L., Yildiz F.H., Golestanian R., Wong G.C.L. *Vibrio cholerae* use pili and flagella synergistically to effect motility switching and conditional surface attachment. *Nat. Commun.*, 2014, vol. 5: 4913. doi: 10.1038/ncomms5913
15. Zeb S., Shah M.A., Yasir M., Awan H.M., Prommeenate P., Klanchui A., Wren B.W., Thomson N., Bokhari H. Type III secretion system confers enhanced virulence in clinical non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*. *Microb. Pathog.*, 2019, vol. 135: 103645. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103645

Авторы:

Монахова Е.В., д.б.н., старший научный сотрудник, главный научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Кругликов В.Д., д.м.н., начальник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Водопьянов А.С., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Селянская Н.А., к.м.н., старший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Ежова М.И., научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Носков А.К., к.м.н., директор ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия.

Authors:

Monakhova E.V., PhD, MD (Biology), Senior Researcher, Head Researcher, Department of Microbiology of Cholera and Other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Kruglikov V.D., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Microbiology of Cholera and Other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Vodop'yanov A.S., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Selyanskaya N.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Microbiology of Cholera and Other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Ezhova M.I., Researcher, Department of Microbiology of Cholera and Other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Noskov A.K., PhD (Medicine), Director of Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation.

ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ OmpF И OmpC ПОРИНОВ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*, ОЦЕНЕННАЯ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ЛОВУШКИ

И.В. Коньшев^{1,2}, О.Д. Новикова³, О.Ю. Портнягина³, А.А. Бывалов^{1,2}

¹ ФГБУН Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар, Россия

² ФБОУ ВО Вятский государственный университет, г. Киров, Россия

³ ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН, г. Владивосток, Россия

Резюме. Введение. Исследование особенностей взаимодействия в системе «антиген–антитело» имеет большое значение для разработки новых современных средств диагностики и терапии инфекционных заболеваний. В этой связи большой интерес представляет изучение природы связи, формируемой между бактериальными антигенами и антителами, с использованием современных биофизических методов. Одним из таких современных подходов является метод оптической ловушки, основанный на использовании лазерного пинцета. Значимость поверхностных антигенов в иммунохимической активности бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* с использованием данного метода ранее не оценивалась. Целью настоящей работы явилось изучение возможности использования метода оптической ловушки для оценки взаимодействия трансмембранных белков, неспецифических поринов *Y. pseudotuberculosis* OmpF- и OmpC-типа, со специфическими антителами. **Материалы и методы.** Очищенные препараты поринов OmpF и OmpC наносили на полистирольные микросферы ($d = 1$ мкм) посредством пассивной адгезии; факт сенсibilизации микросфер верифицировали методом твердофазного иммуноферментного анализа комплементарных антисывороток, истощенных теми или иными микросферами. Антитела в составе мышинных сывороток сорбировали на поверхности стекла посредством химической сшивки. Определение силы связывания в системе «порины–антитела» производили с помощью лазерной ловушки согласно разработанному ранее алгоритму. **Результаты.** С помощью модельной системы, включающей полистирольные микросферы, сенсibilизированные поринами OmpF и OmpC, и подложку из аминированного стекла, покрытую иммунной или неиммунной сывороткой, были выявлены существенные различия в силе связывания поринов OmpF и OmpC с гомологичными антисыворотками по сравнению с неиммунной, контрольной сывороткой. Средняя сила связи при использовании иммунных сывороток составила 60 пН для микросфер «OmpF» (контроль — 40 пН) и 69 пН для микросфер «OmpC» (контроль — 49 пН). Доля необратимых связываний микросфер обоих типов с соответствующими комплементарными антисыворотками оказалась существенно выше по сравнению с использованием интактной сыворотки. Результаты оценки средней силы взаимодействия, а также преобладание доли необратимых связываний

Адрес для переписки:

Бывалов Андрей Анатольевич
610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, 36, каб. 513а,
Вятский государственный университет.
Тел.: 8 (8332) 64-50-69.
E-mail: byvalov@nextmail.ru

Contacts:

Andrey A. Byvalov
610000, Russian Federation, Kirov, Moskovskaya str., 36,
Vyatka State University.
Phone: +7 (8332) 64-50-69.
E-mail: byvalov@nextmail.ru

Для цитирования:

Коньшев И.В., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю., Бывалов А.А.
Имунохимическая активность OmpF и OmpC поринов *Yersinia
pseudotuberculosis*, оцененная методом лазерной ловушки // Инфекция
и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1163–1168. doi: 10.15789/2220-7619-
IAO-2007

Citation:

Konyshov I.V., Novikova O.D., Portnyagina O.Yu., Byvalov A.A.
Immunochemical activity of *Yersinia pseudotuberculosis* OmpF and OmpC
porins evaluated by optical trapping // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1163–1168.
doi: 10.15789/2220-7619-IAO-2007

Исследования проведены в рамках темы НИР ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН FUUU-2022-0065 (№ 1021051201894-0)

The research was conducted within the framework of the research topic FUUU-2022-0065 (No. 1021051201894-0)
of the Komi Scientific Center of the Urals Branch of the Russian Academy of Sciences.

микросфер, нагруженных исследуемыми антигенами, с подложками, обработанными иммунными сыворотками, свидетельствует о том, что в сконструированной нами модельной системе специфические взаимодействия вносят значительный вклад в силу межмолекулярного связывания. Предложенный методический подход может быть применен для оценки сил межмолекулярного взаимодействия в аналогичных модельных системах с использованием иных микробных антигенов.

Ключевые слова: порины, *Yersinia pseudotuberculosis*, антигены, антитела, сенсбилизация, лазерная ловушка.

IMMUNOCHEMICAL ACTIVITY OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* OmpF AND OmpC PORINS EVALUATED BY OPTICAL TRAPPING

Konyshov I.V.^{a,b}, Novikova O.D.^c, Portnyagina O.Yu.^c, Byvalov A.A.^{a,b}

^a Institute of Physiology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russian Federation

^b Vyatka State University, Kirov, Russian Federation

^c Pacific Institute of Bioorganic Chemistry named after G.B. Elyakov of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* Study of features for interacting “antigen-antibody” system is of great importance for developing new modern tools for diagnostics and therapy of infectious diseases. In this regard, it is of great interest to study the rupture force between bacterial antigens and antibodies using modern biophysical methods including optical trapping. The importance of surface antigens in the immunochemical activity of *Yersinia pseudotuberculosis* assessed by such method has not been evaluated yet. In this work we examined an opportunity to evaluate the interaction of hydrophobic *Y. pseudotuberculosis* porins OmpF and OmpC with specific antibodies using optical trapping method. *Materials and methods.* Polystyrene microspheres ($d = 1 \mu\text{m}$) were coated by passive adhesion with purified preparations of OmpF and OmpC porins; microsphere sensitization was verified by enzyme immunoassay. Antibodies from mouse sera were adsorbed onto the glass surface by chemical linking. The rupture force in the “porins-antibodies” system was determined using a laser trap according to the previously developed algorithm. *Results.* Using a model system including polystyrene microspheres sensitized with the proteins and aminated glass substrate coated with immune or nonimmune serum, significant differences in binding strength of OmpF and OmpC porins to homologous immune versus nonimmune sera were detected. The average forces of interaction with immune sera was 60 pN for OmpF microspheres (control — 40 pN) and 69 pN for OmpC microspheres (control — 49 pN). The proportion of irreversible substrate binding of the microspheres coated by the antigens to the treated with immune vs. non-immune sera was significantly higher. The results of assessing the average interaction force, as well as the predominance of the proportion of irreversible binding of antigen-coated microspheres with sera-treated substrates, indicates that specific interactions contribute significantly to the force of interaction. The aforementioned method can be used to evaluate the forces of intermolecular interaction in similar model systems using other microbial antigens.

Key words: porins, *Yersinia pseudotuberculosis*, antigens, antibodies, sensitization, laser trap.

Введение

В настоящее время род *Yersinia*, включенный в семейство *Yersiniaceae*, включает 27 видов бактерий, три из которых — *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *Y. pestis* — патогенны для человека. Заболевания, вызываемые первыми двумя видами, протекают преимущественно в форме острого энтерита с поражением регионарных лимфоузлов и пейеровых бляшек кишечника. Энтеропатогенные представители рода *Yersinia* широко распространены в природных биотопах (почве, воде, растениях), некоторые из них являются зоонозными и обнаруживаются в организме рыб, земноводных и насекомых. Особенности персистенции иерсиний в условиях окружающей среды и те изменения, которые происходят в их клетках в процессе инфицирования теплокровных животных и человека, изучены недостаточно. Большую роль в этих процессах играют

поверхностные антигены бактерий: липополисахарид и белки наружной мембраны.

Преобладающими (до 10^5 копий на клетку) среди белков наружной мембраны грамотрицательных бактерий являются порины, которые относятся к группе трансмембранных интегральных белков, формирующих в бактериальной мембране бочонкообразную структуру с гидрофильной порой внутри [10]. Остатки гидрофобных аминокислот поринов, обращенные наружу, взаимодействуют с липидами бактериальной мембраны; в свою очередь, гидрофильные остатки обращены в полость канала, что обеспечивает трансмембранный перенос низкомолекулярных гидрофильных органических соединений и солей (нутриентов, антибиотиков, солей желчных кислот).

На примере *Escherichia coli* было показано, что уровень экспрессии генов поринов изменяется в зависимости от температуры, pH среды

и осмолярности среды [4, 9]. Подобными свойствами обладают и клетки психротолерантного микроорганизма *Yersinia pseudotuberculosis*: в окружающей среде и при культивировании в диапазоне температур (от +4 до +10°C) в клеточной стенке данного микроба синтезируется преимущественно порин OmpF. При повышении температуры до +37°C, например в условиях избытка нутриентов внутри теплокровного организма, увеличивается продукция белка OmpC, участвующего в формировании пор меньшего размера. Предполагается, что изменение типа неспецифических поринов в бактериальной мембране и связанное с этим изменение ее проницаемости (или эффективности прохождения нутриентов через наружную мембрану) представляет собой один из механизмов адаптации бактерий к изменению условий окружающей среды [9]. Кроме того, порин OmpC обеспечивает дополнительную защиту иерсиний от действия желчных кислот, способствуя их выживанию в тонком кишечнике [12].

Показано участие поринов грамотрицательных бактерий в процессах адгезии, инвазии и формировании устойчивости к компонентам сыворотки [3, 5, 13]. Сообщается также о вкладе поринов ряда бактерий в образование биопленок [11], об их возможном участии в рецепции бактериофагов [8] и в стимуляции синтеза провоспалительных цитокинов в процессе развития иммунного ответа [6].

Цель настоящего исследования состояла в определении методом оптической ловушки силовых характеристик взаимодействия молекул неспецифических поринов OmpF и OmpC *Y. pseudotuberculosis* с сыворотками, содержащими гомологичные антитела.

Материалы и методы

В работе использовали штамм *Y. pseudotuberculosis* серотипа 1b (№ 474), полученный из коллекции ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Порины OmpF и OmpC *Y. pseudotuberculosis* получали из микробной массы, выращенной, соответственно, при +6...+8 и +37°C по ранее описанной методике [2]. Степень очистки полученных образцов поринов анализировали с помощью SDS, ПААГ-электрофореза по методу Лэммли [7]. По данным электрофореза, использованные в эксперименте образцы белков представляли собой гомогенные препараты. До использования в эксперименте препараты поринов хранили при температуре 4–6°C в фосфатном буферном растворе (ФБР), pH 7,2–7,4, содержащем 0,1% SDS. Сенсibilизацию микросфер препаратами поринов, а также валидацию факта указанной сенсibilизации проводили по методикам, описанным в работе [1].

Мышиные антисыворотки к поринам получали, как описано в работе [1]. Титры антител в полученных антипоринных сыворотках определяли с помощью метода непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА), используя микропланшеты Costar (США). Титры иммунных сывороток к поринам OmpF и OmpC составляли 1:62 400 и 1:124 800 соответственно. Нормальную, интактную сыворотку получали от неиммунных мышей. Непосредственно перед использованием препараты сывороток центрифугировали при 10 000g в течение 20 мин. Все эксперименты с животными были проведены в соответствии с положениями Директивы № 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза «О защите животных, используемых для научных целей».

Для сенсibilизации подложек сыворотками использовали пластиковые чашки «Fluorodish» (WPI, Германия) со стеклянным дном, которые предварительно подвергали процедуре аминирования. В отдельной емкости смешивали 10 мкл триэтиламина (Реахим, Россия) и 30 мкл 3-аминопропил-триэтоксисилана (APTES) (Sigma Aldrich, США), после чего помещали ее вместе с чашками в эксикатор и выдерживали в атмосфере аргона в течение 1,5 ч. По окончании процедуры на поверхность чашек наносили последовательно 0,6 мкл EDC (Sigma Aldrich, США), 900 мкл ФБР, 30 мкл 0,46%-ного раствора N-гидроксисукцинимиды (SigmaAldrich, США) и 100 мкл каждой из трех сывороток (в разведении 1:10). Инкубировали чашки в течение ночи при температуре 4–6°C, затем пятикратно промывали деионизованной водой и хранили в закрытом эксикаторе при температуре 4–6°C.

Для оценки сил взаимодействия в модельной системе «микросфера–подложка» использовали лазерный пинцет JPK Nanotracker™ (JPK, Германия) на основе иттрий-гранатового источника инфракрасного излучения ($\lambda = 1064$ нм). Непосредственно перед проведением эксперимента в чашку «Fluorodish», сенсibilизированную одним из трех сывороточных препаратов, приливали 2,5 мл ФБР и 2–4 мкл суспензии микросфер. Тщательно перемешивали содержимое чашки и устанавливали ее на термостатируемую платформу с температурой +37°C. Далее производили калибровку прибора с использованием программы «JPK Calibration Manager» с учетом температуры раствора, диаметра микросфер и вязкости раствора (0,73 сПз). Определенное таким способом среднее значение коэффициента чувствительности квадрантного детектора составило 6,4 мВ/нм, коэффициента жесткости — 0,26 пН/нм.

Методика оценки сил межмолекулярного взаимодействия включала захват микросферы

в фокус лазерной ловушки при мощности лазера 2,0 Вт. После повторной калибровки подвдидили микросферу ко дну чашки таким образом, чтобы расстояние между ними составляло 1,0–1,5 мкм. С помощью пьезостолика прецизионно перемещали чашку в направлении неподвижной микросферы с шагом 50 нм до момента их соприкосновения, который фиксировали по трем последовательным скачкам на хронограмме сигнала. Спустя 1 с после остановки запускали процесс отведения пьезостолика в обратном направлении в полуавтоматическом режиме со скоростью около 150 нм/с. Момент разрыва связи детектировали по скачкообразному изменению сигнала на хронограмме.

Первичные данные сохраняли в виде текстовых файлов, которые затем обрабатывали с использованием специализированного программного обеспечения JPK Processing. Статистический анализ проводили с использованием пакетов программ MatLab 7.0 и Statistica 12.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования иммунохимически был подтвержден факт сенсibilизации полистирольных микросфер препаратами поринов. С помощью метода ТИФА были определены средние значения оптической плотности (OP_{492}) растворов в лунках с внесенными «анти-OmpF» и «анти-OmpC» сыворотками, полученными после инкубации с микросферами, сенсibilизированными гомологичными антигенами. Измеренные значения OP_{492} составили соответственно 0,950 и 0,742 против 1,722 и 2,041 единиц OP_{492} , полученных для супернатантов после инкубации микросфер «БСА» с препаратами этих же сывороток. Активность

исходных иммунных «анти-OmpF» и «анти-OmpC» сывороток, взятых в том же разведении, составила в среднем 1,803 и 2,102 единиц OP_{492} соответственно.

На втором этапе исследования методом оптической ловушки были определены средние силы взаимодействия микросфер, обработанных поринами OmpF и OmpC, с соответствующими гомологичными антисыворотками. Их значения оказались близкими и составили соответственно 60 и 69 пН. При использовании подложки, обработанной нормальной мышинной сывороткой, не содержащей антител к указанным белкам, силы взаимодействия составили в среднем 40 и 49 пН соответственно (табл.). Анализ гистограмм распределения сил разрыва для системы «OmpF–анти-OmpF» показал наличие двух выраженных пиков (в области 20–40 и 110–140 пН). Похожая закономерность характерна и для второй пары взаимодействующих молекул: в системе «OmpC–анти-OmpC» первый пик наблюдался в области 20–40 пН, второй — в области 110–150 пН (рис.).

Можно предположить, что высокоамплитудные отрывы соответствуют специфическим взаимодействиям антигена с иммунной сывороткой, а низкоамплитудные отрывы — неспецифическим взаимодействиям, обусловленным, очевидно, физико-химическими особенностями носителей (полистирола микросфер и стеклянной поверхности, обработанной амилирующим агентом — АРТЕS). При использовании подложек, обработанных нормальной мышинной сывороткой, доля низкоамплитудных отрывов (до 40 пН) составила 57 и 48% для микросфер «OmpF» и «OmpC» соответственно. При использовании чашек, покрытых сыворотками к указанным поринам, доля низко-

Таблица. Силы разрыва связей в системе «микросфера–подложка» для различных комбинаций антигенов и сывороток

Table. Rupture force distribution in the “microsphere–glass surface” system for varying antigen-serum combinations

Показатель Parameter	Значение показателя для модельной системы Parameter magnitude in model system			
	OmpF– анти-OmpF OmpF– anti-OmpF	OmpF–нормальная сыворотка OmpF–normal serum	OmpC– анти-OmpC OmpC– anti-OmpC	OmpC–нормальная сыворотка OmpC–normal serum
Fmean, пН	60±41*	40±31*	69±41**	49±39**
Доля необратимых связываний, % Proportion of irreversible bindings, %	39,4	15,3	39,2	17,9
Доля «нулевых» опытов, % Proportion of «zero» bindings, %	17,9	46,8	16,5	41,9
N	471	326	450	375

Примечание. Fmean — среднее значение силы разрываемой связи; *, ** — различия в парах статистически достоверны для $p > 0,99$; под «нулевым» опытом понимается отсутствие скачка сигнала на хронограмме при отведении пьезостолика.

Note. Fmean — mean value of the ruptured bond strength; *, ** — significant pairwise differences for $p > 0,99$; «zero» binding stands for no signal rise upon piezo table removal.

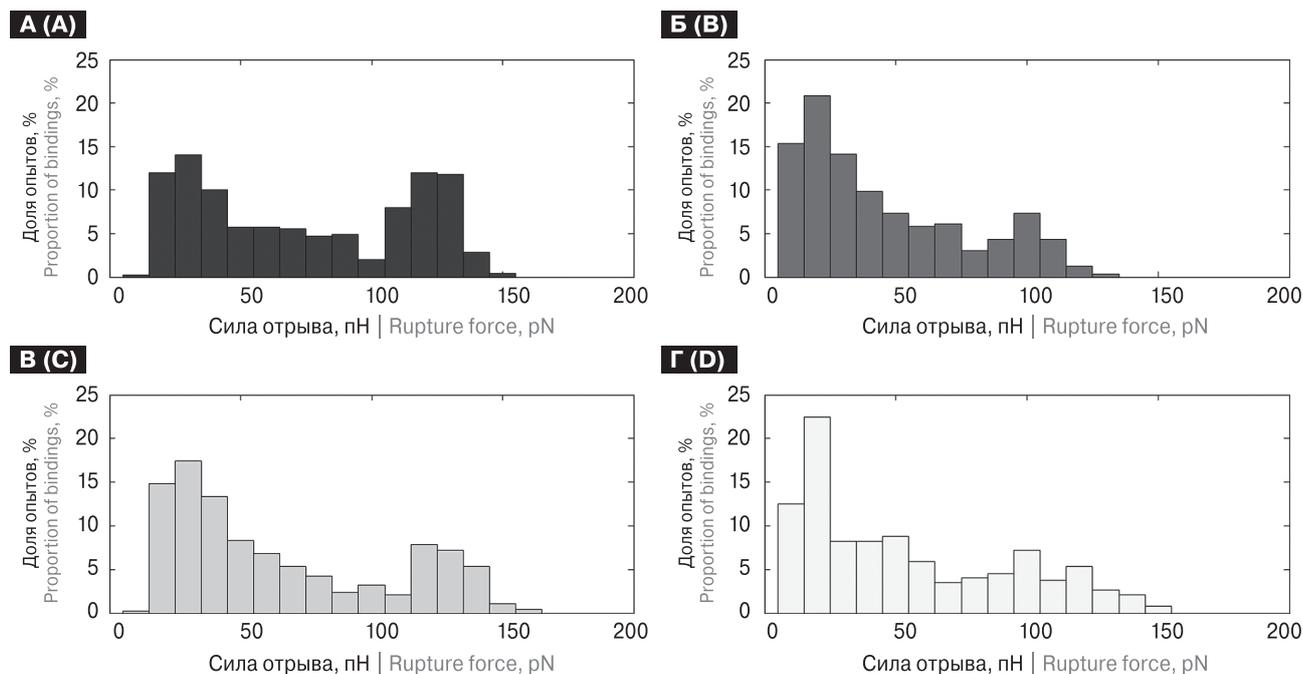


Рисунок. Гистограммы распределения сил разрыва в системе «микросфера–подложка»

Figure. Histograms of rupture force distribution in the “microsphere–glass surface” system

Примечание. А — «OmpF–анти-OmpF», Б — «OmpF–нормальная сыворотка», В — «OmpC–анти-OmpC», Г — «OmpC–нормальная сыворотка».

Note. A — “OmpF–anti-OmpF”, B — “OmpF–normal serum”, C — “OmpC–anti-OmpC”, D — “OmpC–normal serum”.

амплитудных отрывов оказалась существенно ниже — соответственно 30 и 40%. При этом доля необратимых связываний микросфер «OmpF» с комплементарной и контрольной сыворотками составила 39,4 и 15,3%, а для микросфер «OmpC» — 39,2 и 17,9% (табл.).

Как видно из представленных на рисунке данных, связывание исследуемых антигенов с антителами представляет собой сложный процесс, поскольку на всех гистограммах присутствует как низкоамплитудный, так и высокоамплитудный пики. В случае иммунной сыворотки, которая используется в эксперименте в небольшом разведении (1:10), наличие пика в области 20–40 пН может объясняться присутствием сывороточных белков, неспецифически взаимодействующих с БСА, при-

внесенным из блокирующего буфера в состав сенситина на микросферах. Тем не менее преобладание доли необратимых связываний нагруженных исследуемыми антигенами микросфер с подложками, обработанными иммунными сыворотками, свидетельствует о том, что в сконструированной нами модельной системе специфические взаимодействия вносят значительный вклад в силу межмолекулярного связывания (табл.).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что апробированные нами методические подходы, основанные на использовании оптического пинцета, позволяют оценивать силовые характеристики межмолекулярного взаимодействия различных микробных антигенов и антител.

Список литературы/References

1. Бывалов А.А., Конышев И.В., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю., Белозеров В.С., Хоменко В.А., Давыдова В.Н. Адгезивность поринов OmpF и OmpC *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам J774 // Биофизика. 2018. Т. 63, № 5. С. 913–922. [Byvalov A.A., Konyshev I.V., Novikova O.D., Portnyagina O.Yu., Belozеров V.S., Khomenko V.A., Davydova V.N. Adhesiveness of OmpF and OmpC porins from *Yersinia pseudotuberculosis* to macrophages J774. *Biofizika = Biophysics*, 2018, vol. 63, no. 5, pp. 913–922. (In Russ.)]
2. Новикова О.Д., Федорева Л.И., Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Ермак И.М., Лихацкая Г.Н., Мороз С.В., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. Влияние способа экстракции порообразующего белка из *Yersinia pseudotuberculosis* на его макромолекулярную организацию // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19, № 5. С. 536–547. [Novikova O.D., Fedoreeva L.I., Khomenko V.A., Portnyagina O.Y., Ermak I.M., Likhatskaya G.N., Moroz S.V., Solovieva T.F., Ovodov Yu S. Effect of the method of extraction of pore-forming protein from *Yersinia pseudotuberculosis* on its macromolecular organization. *Bioorganicheskaya khimiya = Bioorganic Chemistry*, 1993, vol. 19, no. 5, pp. 536–547. (In Russ.)]

3. Achouak W., Heulin T., Pages J.M. Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001, vol. 199, pp. 1–7. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10642.x
4. Csonka L.N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.*, 1989, vol. 53, pp. 121–147. doi: 10.1128/mr.53.1.121-147.1989
5. Duperthuy M., Binesse J., Le Roux F., Romestand B., Caro A., Got P., Givaudan A., Mazel D., Bachère E., Destoumieux-Garzón D. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ. Microbiol.*, 2010, vol. 12, pp. 951–963. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02138.x
6. Galdiero S., Falanga A., Cantisani M., Tarallo R., Della Pepa M.E., D’Orlando V., Galdiero M. Microbe-host interactions: structure and role of Gram-negative bacterial porins. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2012, vol. 13, pp. 843–854. doi: 10.2174/138920312804871120
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0
8. Leon-Velarde C.G., Happonen L., Pajunen M., Leskinen K., Kropinski A.M., Mattinen L., Rajtor M., Zur J., Smith D., Chen S., Nawaz A., Johnson R.P., Odumeru J.A., Griffiths M.W., Skurnik M. *Yersinia enterocolitica*-specific infection by Bacteriophages TG1 and ϕ R1-RT is dependent on temperature-regulated expression of the phage host receptor OmpF. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016, vol. 82, pp. 5340–5453. doi: 10.1128/AEM.01594-16
9. Liu X., Ferenci T. An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of OmpF and OmpC porin expression under nutrient limitation. *Microbiology*, 2001, vol. 147, pp. 2981–2989. doi: 10.1099/00221287-147-11-2981
10. Nikaido H. *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology. Outer membrane. Ed. F.C. Neidhardt. *ASM Press D.C.*, 1996, pp. 29–47.
11. Pompilio A., Scribano D., Sarshar M., Di Bonaventura G., Palamara A.T., Ambrosi C. Gram-negative bacteria holding together in a biofilm: the *Acinetobacter baumannii* way. *Microorganisms*, 2021, vol. 9: 1353. doi: 10.3390/microorganisms9071353
12. Thanassi D.G., Cheng L.W., Nikaido H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1997, vol. 179, pp. 2512–2518. doi: 10.1128/jb.179.8.2512-2518.1997
13. Van Putten J.P., Duensing T.D., Carlson J. Gonococcal invasion of epithelial cells driven by P.IA, a bacterial ion channel with GTP binding properties. *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 188, pp. 941–952. doi: 10.1084/jem.188.5.941

Авторы:

Конышев И.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории физиологии микроорганизмов ФГБУН Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар, Россия; доцент кафедры биотехнологии Институт биологии и биотехнологии ФБОУ ВО Вятский государственный университет, г. Киров, Россия;

Новикова О.Д., д.х.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН, г. Владивосток, Россия;

Портнягина О.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН, г. Владивосток, Россия;

Бывалов А.А., д.м.н., профессор, старший научный сотрудник Центра превосходства «Фармацевтическая биотехнология» ФБОУ ВО Вятский государственный университет, г. Киров, Россия; зав. лабораторией физиологии микроорганизмов Института физиологии ФГБУН Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар, Россия.

Authors:

Konyshev I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Microbial Physiology, Institute of Physiology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russian Federation; Associate Professor, Department of Biotechnology, Institute of Biology and Biotechnology, Vyatka State University, Kirov, Russian Federation;

Novikova O.D., PhD, MD (Chemistry), Head Researcher, Laboratory of Molecular Basis of Antibacterial Immunity, Pacific Institute of Bioorganic Chemistry named after G.B. Yelyakov of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation;

Portnyagina O.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Basis of Antibacterial Immunity, Pacific Institute of Bioorganic Chemistry named after G.B. Elyakov of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation;

Byvalov A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Researcher, Center of Excellence «Pharmaceutical Biotechnology», Vyatka State University, Kirov, Russian Federation; Head of the Laboratory of Microbial Physiology, Institute of Physiology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russian Federation.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ СООБЩЕСТВА ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* В КИШЕЧНОМ БИОТОПЕ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

А.А. Холодов, Ю.В. Захарова, Л.Ю. Отдушкина, Е.О. Брюхачева, Т.В. Пьянзова

Кемеровский государственный медицинский университет, г. Кемерово, Россия

Резюме. Грибы являются оппортунистическими микроорганизмами, колонизирующими все биотопы организма человека, в том числе кишечный. При возникновении неблагоприятных факторов (ВИЧ-инфекция, другие иммунодефициты, антибактериальная терапия) данные микроорганизмы начинают активное размножение, что приводит к необходимости назначения антимикотиков. Частое их применение в клинической практике индуцирует развитие лекарственной резистентности грибов к противогрибковым препаратам, что может влиять на эффективность лечения микозов. Цель исследования — оценить структуру и спектр лекарственной устойчивости грибов рода *Candida* в кишечном биотопе пациентов с туберкулезом органов дыхания и выявить факторы риска развития тотальной лекарственной устойчивости грибов к антимикотическим лекарственным средствам. **Материалы и методы.** В исследование включен 21 пациент с туберкулезом органов дыхания. В ходе исследования оценена структура видового разнообразия выделенных из фекалий грибов рода *Candida*, а также определен спектр их лекарственной резистентности к антимикотическим препаратам. Пациенты ($n = 21$) разделены на 2 группы: с тотальной резистентностью к антимикотикам ($n = 10$) и без нее ($n = 11$), после чего определены основные факторы риска ее развития. **Результаты.** Представители грибов рода *Candida* были выделены у всех включенных в исследование пациентов, при этом чистые культуры характеризовались высоким уровнем резистентности к антимикотикам. Устойчивость к трем препаратам отмечалась у 1 культуры (4,8%), к четырем — у 10 культур (47,6%), ко всем определяемым препаратам — также у 10 культур (47,6%). При статистической обработке получены данные о влиянии на формирование тотальной резистентности к антимикотикам сопутствующей патологии желудочно-кишечного тракта, наличия клинически значимого диспептического синдрома, антимикотической терапии в анамнезе, ВИЧ-инфекции с выраженным иммунодефицитом, установленным по снижению уровня CD4⁺ лимфоцитов в крови. **Выводы.** Выделенные от больных туберкулезом грибы рода *Candida* характеризовались высоким уровнем резистентности к антимикотикам. Тотальная резистентность при этом наблюдалась у 47,6% пациентов. Помимо того, основными грибами, колонизирующими кишечник больных туберкулезом являлись грибы вида *Candida albicans*. К факторам риска развития тотальной резистентности грибов к антимикотикам относились хронические энтероколиты, диспептический синдром, количество CD4⁺ лимфоцитов менее 350 кл./мкл, антимикотическая терапия в анамнезе.

Ключевые слова: туберкулез, микробиоценоз кишечника, микозы, ВИЧ-инфекция, коинфекция ТБ/ВИЧ, лекарственная резистентность, грибы рода *Candida*.

Адрес для переписки:

Холодов Артем Андреевич
650029, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22А,
ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский
университет.
Тел.: 8 (3842) 54-56-51.
E-mail: artyomkass96@gmail.com

Contacts:

Artyom A. Kholodov
650029, Russian Federation, Kemerovo, Voroshilov str., 22A,
Kemerovo State Medical University.
Phone: +7 (3842) 54-56-51.
E-mail: artyomkass96@gmail.com

Для цитирования:

Холодов А.А., Захарова Ю.В., Отдушкина Л.Ю., Брюхачева Е.О.,
Пьянзова Т.В. Особенности структуры сообщества грибов рода *Candida*
в кишечном биотопе больных туберкулезом // Инфекция и иммунитет.
2022. Т. 12, № 6. С. 1169–1174. doi: 10.15789/2220-7619-FOT-1974

Citation:

Kholodov A.A., Zakharova Yu.V., Otdushkina L.Yu., Bryukhacheva E.O.,
Pyanzova T.V. Features of the *Candida* genus community pattern
in the intestinal biotope of patients with tuberculosis // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6,
pp. 1169–1174. doi: 10.15789/2220-7619-FOT-1974

FEATURES OF THE *CANDIDA* GENUS COMMUNITY PATTERN IN THE INTESTINAL BIOTOPE OF PATIENTS WITH TUBERCULOSIS

Kholodov A.A., Zakharova Yu.V., Otdushkina L.Yu., Bryukhacheva E.O., Pyanzova T.V.

Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Fungi are opportunistic microorganisms that colonize all biotopes of the human body, including intestinal. In case of emerging adverse environmental factors (HIV infection, other immunodeficiencies, antibiotic therapy), these microbial representatives begin active reproduction, which might require prescribing antimycotics. Frequent use of the latter in clinical practice induces the development of drug resistance to antifungal drugs, which may impact on effectiveness of both the treatment of fungal infections and other diseases. The purpose of the study was to assess the pattern and spectrum of drug resistance of *Candida* genus in the intestinal biotope of patients with respiratory tuberculosis and identify risk factors for developing total fungal drug resistance to antimycotic drugs. *Material and methods.* There were enrolled 21 patients with respiratory tuberculosis. Pattern of the fungal species diversity for the *Candida* genus isolated from faeces was evaluated, and the spectrum of relevant drug resistance to antimycotic drugs was determined. Patients (n = 21) were divided into 2 groups: with (n = 10) and without (n = 11) total resistance to antimycotics, after which the main risk factors for its development were identified. *Results.* Members of the *Candida* genus were isolated from all patients examined, wherein pure cell cultures were characterized by high level of antimycotics resistance. Resistance to three drugs was noted in 1 culture (4.8%), to four — in 10 cultures (47.6%), also found in 10 cultures to the entire drug panel (47.6%). During statistical processing, the data were obtained on affecting formation of total resistance to antimycotics of concomitant pathology of the gastrointestinal tract, the presence of a clinically significant dyspeptic syndrome, a history of antimycotic therapy, HIV infection with severe immunodeficiency, and some decrease in the peripheral blood CD4⁺ lymphocyte count. *Conclusion.* Fungi of the *Candida* genus isolated from tuberculosis patients were characterized by high level of resistance to antimycotics. Total resistance was observed in 47.6% of patients. In addition, the major fungi colonizing the intestines of tuberculosis patients were found to be *Candida albicans* species. The risk factors for the development of total antifungal resistance included: chronic enterocolitis, dyspeptic syndrome, peripheral blood CD4⁺ lymphocyte count lower than 350 cells/ μ l, and history of antimycotic therapy.

Key words: tuberculosis, intestinal microbiocenosis, mycoses, HIV infection, TB/HIV co-infection, drug resistance, *Candida* spp.

Введение

Грибы присутствуют в различных биотопах организма человека. Количественное увеличение их представительства в просвете желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) обуславливает клинические проявления, например диспептический синдром [11]. Количество грибов, являющихся оппортунистическими микроорганизмами, не должно превышать диагностических титров, в том числе и в кишечном биотопе [10]. Однако возможность их активного размножения определяется рядом факторов. Во-первых, развитие микозов сопровождается заболеваниями, приводящие к иммунодефициту, что наиболее актуально для ВИЧ-инфицированных пациентов [1, 8, 9, 15]. Одним из индикаторов размножения грибов является развитие микоза полости рта, при котором на фоне антимикотической терапии активно используют местные антисептики [3]. Во-вторых, ввиду использования во фтизиатрической практике большого количества противотуберкулезных препаратов (ПТП), нарушается равновесие между облигатной и условно-патогенной микрофлорой ЖКТ, что ведет к увеличению количества факультативных ее представителей, в том числе грибов [5, 13]. В основе эффективного лечения кандидозов в клинической практике активно используются антимикотические препараты [4]. С каждым их назначением

повышается и риск формирования лекарственной устойчивости (ЛУ) грибов к ним [7, 12, 14]. В литературе недостаточно данных об особенностях ЛУ грибов к антимикотикам во фтизиатрической практике. Этот вопрос особенно актуален в условиях роста распространенности коинфекции ТБ/ВИЧ и множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) возбудителя туберкулеза [2, 6], что создает необходимость проведения исследований в данной области.

Целью настоящего исследования явилась оценка структуры и спектра лекарственной устойчивости грибов рода *Candida* в кишечном биотопе пациентов с туберкулезом и установление факторов риска развития тотальной ЛУ грибов к антимикотикам.

Материалы и методы

Исследование проводили на базе Кузбасского клинического фтизиопульмонологического медицинского центра имени И.Ф. Копыловой в 2021 г. В исследование был включен 21 пациент с туберкулезом органов дыхания и МЛУ возбудителя, получающий противотуберкулезную терапию в условиях круглосуточного стационара. Критериями включения служили: наличие туберкулеза органов дыхания с МЛУ возбудителя, лечение по IV режиму химиотерапии с приемом на момент исследования не менее 30-ти доз ПТП.

Критериями исключения являлись: выраженный иммунодефицит у ВИЧ-инфицированных (количество CD4⁺ лимфоцитов менее 200 кл./мкл). В качестве источников информации использовали медицинские карты стационарного больного (форма 003/у), данные микробиологического исследования кала пациентов. В процессе исследования оценена структура микозов в кишечном биотопе пациентов и спектр ЛУ грибов рода *Candida*. В дальнейшем пациенты разделены на 2 группы: в I группу (n = 10) вошли пациенты с тотальной ЛУ грибов к антимикотикам, во II группу (n = 11) — пациенты без нее.

В исследовании использовали количественный бактериологический метод. Материал забирали в стерильный контейнер и транспортировали в лабораторию в течение 2 ч после сбора. Затем готовили разведения материала от 10⁻¹ до 10⁻⁹ и определяли его рН, после чего производили посев на селективные питательные среды. Для выделения грибов использовали среду Сабуро. Выделенные культуры идентифицировали по особенностям биохимических, а также комплекса морфологических, культуральных и тинкториальных свойств. Результаты выражали в lg КОЕ/г с пересчетом на грамм материала. Спектр ЛУ оценивали при помощи стандартного диско-диффузионного метода.

Статистическая обработка данных выполнена при помощи программы IBM SPSS. Качественные признаки представлены абсолютными и относительными частотами, выраженными в процентах с рассчитанными для них 95% доверительными интервалами по методу Уилсона (отн.% [95%ДИ]). Количественные данные представлены в формате медианы и интерквартильного интервала (Ме [25; 75]). Для переменных, относящихся к порядковой шкале, и непараметрических количественных переменных использовали U-тест Манна–Уитни для сравнения двух групп наблюдений. Различия в сравниваемых группах считали статистически значимыми при значении p менее 0,05. Учитывая объем представленной выборки использовали поправку Йейтса.

Результаты

В ходе микробиологического исследования грибы рода *Candida* выявлены у всех (100%) пациентов, включенных в исследование. В структуре выделенных представителей преобладала *C. albicans*, реже наблюдали *C. neoformans*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, единичными случаями представлены *C. parapsilosis* и *C. famata*. Необходимо отметить, что в 9 случаях (42,9%) от одного пациента получено 2 и более вида грибов, а среднее количество представителей *Candida* spp. находилось в пределах 4 [3; 4,75] lg КОЕ/г. Структура микозов представлена на рис. 1.

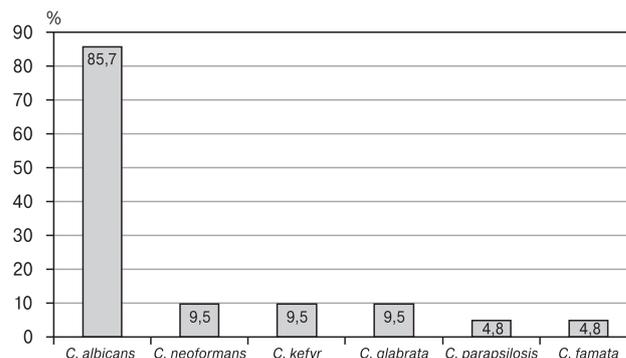


Рисунок 1. Характеристика структуры выделенных грибов рода *Candida* в кишечном биотопе исследуемых пациентов

Figure 1. Characteristics of the pattern of isolated *Candida* genus in the intestinal biotope of the patients studied

Выделенные грибы характеризовались высокой резистентностью к антимикотическим препаратам *in vitro*. Устойчивость к трем антимикотикам отмечалась у 1 культуры (4,8%), к четырем — у 10 культур (47,6%), ко всем определяемым препаратам — также у 10 культур (47,6%). Чаще всего выявляли резистентность культур к кетоконазолу и итраконазолу, реже — к ко-тримоксазолу, нистатину, флуконазолу и амфотерицину. Данные по частоте выявления ЛУ представлены на рис. 2.

Важно отметить, что при данной картине лекарственной резистентности грибов рода *Candida* у 8 пациентов (38,1%) был замечен клинический эффект при лечении микоза полости рта.

Наибольшую практическую значимость имеет тотальная резистентность грибов к антимикотикам у пациентов, частота встречаемости которой в данном исследовании достигала

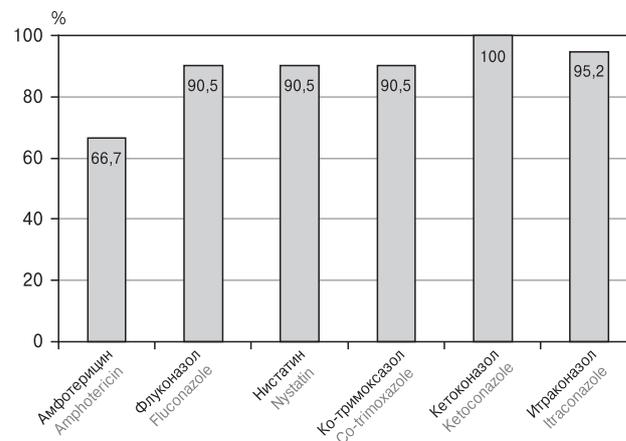


Рисунок 2. Частота выявления ЛУ грибов рода *Candida* к различным противогрибковым препаратам

Figure 2. The frequency of detected varying antifungal DR for the *Candida* genus

47,6%. В этой связи являлось необходимым выявить факторы риска ее развития у больных туберкулезом в условиях высокой распространенности ВИЧ-инфекции.

В I группе наблюдали 7 мужчин (70%) и 3 женщин (30%), во II группе — 8 (72,7%) и 3 (27,3%) человек соответственно ($p = 0,81$). Средний возраст пациентов I группы составил 45 [34; 50] лет, во II группе — 47 [40; 54] лет ($p = 0,56$). По структуре клинических форм туберкулеза статистически значимых различий не получено, в процессе их изучения выявлено преобладание диссеминированной (в I группе 40%, во II группе — 36,4%) и инфильтративной (в I группе 50%, во II — 45,5%) клинической формы. Также статистически значимых различий не обнаружено при оценке приема ПТП, входящих в схемы лечения. В среднем пациен-

ты I группы на момент исследования приняли 34 [25; 48] доз ПТП, пациенты II группы — 40 [30; 61,25] доз ($p = 0,25$). При детальной характеристике сопутствующей патологии, связанной с ЖКТ, найдены статистически значимые различия в отношении хронических энтероколитов, которые представлены у 20% пациентов I группы и ни у одного пациента II группы ($\chi^2 = 2,1$; $p = 0,01$), однако влияние остальных нозологий на формирование ЛУ к антимикотикам не подтвердилось (табл. 1).

В I группе наблюдали 6 пациентов (60%) с синдромом зависимости от психоактивных веществ, во II группе их было 4 (36,4%) ($p = 0,27$). Синдромом зависимости от алкоголя страдали 4 человека (40%) I группы и 4 человека (36,4%) II группы ($p = 0,90$). Низкий социальный статус отмечен у 8 человек (80%) I и у 3 че-

Таблица 1. Влияние сопутствующей патологии желудочно-кишечного тракта на формирование тотальной ЛУ грибов к антимикотикам

Table 1. An impact of the gastrointestinal tract concomitant pathology on formation of total antifungal DR

Хронические заболевания ЖКТ Chronic diseases of the gastrointestinal tract	Пациенты с тотальной ЛУ к антимикотикам Patients with total DR to antimycotics		Пациенты без тотальной ЛУ к антимикотикам Patients without total DR to antimycotics		Достигнутая значимость различий Achieved significance of differences
	абс. abs.	%	абс. abs.	%	
Энтероколит Enterocolitis	2	20	0	0	0,01
Гастродуоденит Gastroduodenitis	3	30	4	36,4	0,12
Панкреатит Pancreatitis	1	10	1	9,1	0,56
Гепатит (в т.ч. вирусный) Hepatitis (including viral hepatitis)	5	50	5	45,5	0,86
Холецистит Cholecystitis	5	50	5	45,5	0,86

Таблица 2. Характеристика факторов риска развития ЛУ к антимикотикам среди пациентов с коинфекцией ТБ/ВИЧ

Table 2. Characteristics of risk factors for developing DR to antimycotics among patients with TB/HIV co-infection

Фактор Factor	Пациенты с тотальной ЛУ к антимикотикам Patients with total LU to antimycotics		Пациенты без тотальной ЛУ к антимикотикам Patients without total LU to antimycotics		Достигнутая значимость различий Achieved significance of differences
	абс. abs.	%	абс. abs.	%	
Наличие ВИЧ-инфекции у пациента Comorbid HIV infection	7	70	7	63,6	0,75
Количество CD4 ⁺ лимфоцитов менее 350 клеток в 1 мкл CD4 ⁺ lymphocyte count lower than 350 cells/ μ l	4	40	2	18,2	0,02
Длительность анамнеза по ВИЧ-инфекции более 5-ти лет Duration HIV infection more than 5 years	4	40	4	36,4	0,90
Низкая приверженность к АРТ Low adherence to ART	3	30	3	27,3	0,88

ловек (27,3%) II группы ($\chi^2 = 5,8$; $p = 0,01$; ОШ = 10; 95% ДИ [1,4–82,0]).

Диспептический синдром развивался у 7 человек (70%) I группы и у 2 человек (18,2%) II группы ($\chi^2 = 5,7$; $p = 0,01$; ОШ = 10; 95% ДИ [1,3–81,1]). Антимикотическую терапию ранее принимали 5 человек (50%) I группы и 1 человек (9,1%) II группы ($\chi^2 = 7,2$; $p = 0,008$; ОШ = 10; 95% ДИ [0,9–110,3]). Более одного представителя *Candida* spp. выделено от 5 человек (50%) I группы и 4 человек (36,7%) II группы ($p = 0,28$).

Оценка возможного влияния наличия ВИЧ-инфекции на формирование тотальной устойчивости грибов к антимикотикам не привела к статистически значимым результатам ($p = 0,75$). Однако при детальном изучении клинико-anamnestических данных пациентов с коинфекцией ТБ/ВИЧ установлена высокая частота встречаемости тотальной резистентности *Candida* spp. к антимикотикам у лиц с выраженным иммунодефицитом — 40 против 18,2% пациентов ($\chi^2 = 1,54$; $p = 0,02$; ОШ = 2,5; 95% ДИ [1,1–9,4]). При этом влияние на нее других факторов (приверженность к АРТ, длительность анамнеза по ВИЧ-инфекции) не доказано ($p = 0,88$ и $p = 0,90$ соответственно). Данные представлены в табл. 2.

Обсуждение

Таким образом, грибы рода *Candida* в кишечном биотопе выделялись у всех обследованных пациентов с туберкулезом органов дыхания, при этом у 42,9% пациентов идентифицировано более двух их культур, что объясняется высокой долей среди них больных с коинфекцией ТБ/ВИЧ [3]. Важно отметить, что выделенные культуры характеризовались высокой резистентностью к антимикотическим препаратам, в том числе и тотальной у 47,6% пациентов. Несмотря на представленную частоту

резистентности, у 38,1% пациентов отмечалась клиническая эффективность противогрибковой терапии на основании осмотра полости рта. Данный феномен объясним использованием у пациентов местной антисептической терапии растворами хлоргексидина [6]. Ранее научным сообществом не оценивались факторы риска развития тотальной лекарственной резистентности грибов рода *Candida* у больных туберкулезом. В ходе данного исследования показано влияние на ее формирование таких факторов, как наличие хронического энтероколита, клинически значимого диспептического синдрома, выраженного иммунодефицита у больных ВИЧ-инфекцией, антимикотической терапии в анамнезе.

Выводы

В структуре выделенных представителей грибковой микрофлоры в 85,7% преобладала *C. albicans*.

Грибы рода *Candida* выделялись в кишечном биотопе больных туберкулезом, получающих противотуберкулезную терапию, в 100% случаев и характеризовались высоким уровнем устойчивости к антимикотическим препаратам, в том числе тотальным в 47,6% случаев.

Факторами риска развития тотальной резистентности грибов к антимикотикам явились: клинически значимый диспептический синдром (ОШ = 10), количество CD4⁺ лимфоцитов менее 350 кл./мкл (ОШ = 2,5), наличие коморбидной патологии ЖКТ в виде хронического энтероколита ($p = 0,01$), прием антимикотической терапии в анамнезе (ОШ = 10).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Байжанов А.К., Нишонова Н.Х. Орофарингальный кандидоз у больных СПИД // Современные вопросы науки и практики. 2021. С. 125–127. [Baizhanov A.K., Nishonova N.Kh. Oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS. *Sovremennye voprosy nauki i praktiki = Modern Issues of Science and Practice*, 2021, pp. 125–127. (In Russ.)]
2. Блат С.Ф., Хавкин А.И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2011. Т. 56, № 1. С. 66–72. [Blat S.F., Khavkin A.I. Intestinal microbiocenosis and immunity. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2011, vol. 56, no. 1, pp. 66–72. (In Russ.)]
3. Викторова И.Б., Ханин А.Л., Зими́на В.Н. Летальные исходы у больных с ВИЧ-инфекцией в крупном противотуберкулезном учреждении Кемеровской области // Журнал инфектологии. 2017. Т. 9, № 3. С. 25–31. [Viktorova I.B., Khanin A.L., Zimina V.N. Lethal outcomes in patients with HIV infection in a large TB facility in the Kemerovo Region. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2017, vol. 9, no. 3, pp. 25–31. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2017-9-3-25-31
4. Воропаев А.Д., Екатеринбург Д.А., Несви́жский Ю.В., Зверев В.В., Афанасьев С.С., Волчкова Е.В., Афанасьев М.С., Буданова Е.В., Бошняк Р.Е., Лиханская Е.И., Урбан Ю.Н., Сулейманова М.Э., Воропаева В.А., Филина Ю.С. Структура сообщества грибов рода *Candida* в ротоглотке ВИЧ-инфицированных пациентов // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 737–744. [Voropaev A.D., Yekaterinchev D.A., Nesvizhsky Yu.V., Zverev V.V., Afanasiev S.S., Volchkova E.V., Afanasiev M.S., Budanova E.V., Boshjan R.E., Likhanskaya E.I., Urban Y.N., Suleymanova M.E., Voropaeva V.A., Filina Yu.S. The structure of the oropharyngeal genus *Candida* fungi community in HIV-infected patients. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 737–744. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-TSO-1450

5. Клясова Г.А., Мальчикова А.О., Тандилова К.С., Блохина Е.В., Паровичникова Е.Н., Кравченко С.К., Савченко В.Г. Лечение кандидемий, вызванных *Candida albicans* и *Candida non-albicans*, у больных с опухолями системы крови // Терапевтический архив. 2019. Т. 91, № 8. С. 84–92. [Klyasova G.A., Mal'chikova A.O., Tandilova K.S., Blokhina E.V., Parovichnikova E.N., Kravchenko S.K., Savchenko V.G. Treatment of candidemia caused by *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in patients with tumors of the blood system. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2019, vol. 91, no. 8, pp. 84–92. (In Russ.)] doi: 10.26442/00403660.2019.08.000385
6. Комиссарова О.Г., Шорохова В.А., Абдуллаев Р.Ю. Состояние кишечной микрофлоры при туберкулезе // Вестник ЦНИИТ. 2021. № 3 (16). С. 19–29. [Komissarova O.G., Shorokhova V.A., Abdullaev R.Yu. State of the intestinal microflora in tuberculosis. *Vestnik Tsentral'nogo nauchno-issledovatel'skogo instituta tuberkuleza = CTRI Bulletin*, 2021, no. 3, pp. 19–29. (In Russ.)]
7. Копылова И.Ф., Кобелева Г.В., Пьянзова Т.В., Байбородова Т.И. Летальные исходы у больных туберкулезом в динамике за 17 лет в Кемеровской области // Туберкулез и болезни легких. 2016. Т. 94, № 7. С. 25–29. [Kopylova I.F., Kobleleva G.V., Pyanzova T.V., Baiborodova T.I. Lethal outcomes in patients with tuberculosis over 17 years in the Kemerovo region. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2016, vol. 94, no. 7, pp. 25–29. (In Russ.)] doi: 10.21292/2075-1230-2016-94-7-25-29
8. Муслимова С.З. Сравнительная эффективность применения залаина в терапии острого урогенитального кандидоза // Вестник новых медицинских технологий. 2007. Т. 14, № 3. С. 69–71. [Muslimova S.Z. Comparative efficacy of zalain in the treatment of acute urogenital candidiasis. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii = Bulletin of New Medical Technologies*, 2007, vol. 14, no. 3, pp. 69–71. (In Russ.)]
9. Попова Д.М., Вознесенский С.Л., Петрова Е.В., Соболева З.А. Особенности микробиоценоза желудочно-кишечного тракта у больных ВИЧ-инфекцией // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2021. Т. 11, № 1. С. 77–83. [Popova D.M., Voznesenskii S.L., Petrova E.V., Soboleva Z.A. Features of microbiocenosis of the gastrointestinal tract in patients with HIV infection. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Topical Issues*, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 77–83. (In Russ.)] doi: 10.18565/epidem.2021.11.1.77-83
10. Пузырева Л.В., Королев Л.Б., Мордык А.В., Руденко С.А., Антропова В.В., Ситникова С.В. Микоз ногтей и кожи у ВИЧ-инфицированных пациентов // Инфекционные болезни. 2020. Т. 18, № 1. С. 85–89. [Puzyreva L.V., Korolev L.B., Mordyk A.V., Rudenko S.A., Antropova V.V., Sitnikova S.V. Mycosis of nails and skin in HIV-infected patients. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2020, vol. 18, no. 1, pp. 85–89. (In Russ.)] doi: 10.20953/1729-9225-2020-1-85-89
11. Тарасова А.Д., Шаяхметова Д.В. Кандидоз желудочно-кишечного тракта // Успехи медицинской микологии. 2019. Т. 20. С. 302–306. [Tarasova A.D., Shayakhmetova D.V. Candidiasis of the gastrointestinal tract. *Uspekhi meditsinskoi mikologii = Advances in Medical Mycology*, 2019, vol. 20, pp. 302–306. (In Russ.)]
12. Lee Y., Puumala E., Robbins N., Cowen L.E. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem. Rev.*, 2020, vol. 121, no. 6, pp. 3390–3411. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199
13. Nikolayan L.T., Beglaryan N.R., Hayrapetyan A.O. Nonspecific microflora in patients associated with pulmonary multidrug-resistant tuberculosis. *Eur. Resp. J.*, 2015, 46: PA2692. doi: 10.1183/13993003.congress-2015.PA2692
14. Srivastava V., Singla R.K., Dubey A.K. Emerging virulence, drug resistance and future anti-fungal drugs for *Candida* pathogens. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2018, vol. 18, no. 9, pp. 759–778. doi: 10.2174/1568026618666180528121707
15. Zeng B.S., Zeng B.Y., Hung C.M., Chen T.Y., Wu Y.C., Tu Y.K., Lin P.Y., Su K.P., Stubbs B., Sun C.K., Cheng Y.S., Li D.J., Liang C.S., Hsu C.W., Chen Y.W., Tseng P.T., Chen C.H. Efficacy and acceptability of different anti-fungal interventions in oropharyngeal or esophageal candidiasis in HIV co-infected adults: a pilot network meta-analysis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2021, vol. 19, no. 11, pp. 1469–1479. doi: 10.1080/14787210.2021.1922078

Авторы:

Холодов А.А., клинический ординатор кафедры фтизиатрии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;

Захарова Ю.В., д.м.н., доцент, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;

Отдушкина Л.Ю., ассистент кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;

Брюхачева Е.О., ассистент кафедры фтизиатрии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;

Пьянзова Т.В., д.м.н., доцент, зав. кафедрой фтизиатрии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия.

Authors:

Kholodov A.A., Clinical Resident, Department of Phthisiology, Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation;

Zakharova Yu.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation;

Otdushkina L.Yu., Assistant Professor, Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation;

Bryukhacheva E.O., Assistant Professor, Department of Phthisiology, Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation;

Pyanzova T.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Phthisiology, Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation.

ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР И ВИРУСА ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА 6 ТИПА НА ТЕЧЕНИЕ И КОНТРОЛЬ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ ПРИАМУРЬЯ

Е.Н. Супрун^{1,2}, С.В. Супрун¹, М.А. Власова¹, Н.И. Кудерова¹, Г.П. Евсеева¹,
О.А. Лебедько¹

¹Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания —
Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

²ФГБОУ ВО Дальневосточный государственный медицинский университет, г. Хабаровск, Россия

Резюме. Роль вирусной инфекции при бронхиальной астме (БА) давно известна и отражена, в частности, в GINA. Особый интерес представляет влияние на течение БА внутриклеточных персистирующих вирусов группы герпеса. Наиболее распространенными из них являются цитомегаловирус, вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) и вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6). Роль цитомегаловируса рассматривалась в наших предыдущих работах, поэтому данное исследование посвящено ВЭБ и ВГЧ-6. Нами обследовано 167 детей с БА, постановка диагноза и клиническая оценка заболевания проводились согласно действующим национальным клиническим рекомендациям. Сформированы группы пациентов с контролируемой ($n = 70$), частично контролируемой и неконтролируемой БА ($n = 97$). У пациентов определялись ДНК ВЭБ и ВГЧ-6 в мазке из зева методом ПЦР; уровень IgA, IgM, IgG, IgE (общего и специфических), IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-18 и TNF α в сыворотке крови иммуноферментным методом; субпопуляции лимфоцитов — методом проточной цитометрии. Доза топического глюкокортикостероида (ТГКС) учитывалась в пересчете на эквивалент по флутиказону, функция внешнего дыхания исследовалась методом спирометрии. ДНК ВЭБ была обнаружена у 14,2% пациентов, ВГЧ-6 — у 19,0%, ДНК обоих возбудителей — у 14,4%, у 52,4% пациентов ДНК возбудителя не была выявлена. При этом у больных с неконтролируемой БА достоверно чаще (для ВЭБ 17,1% против 4,5%, для ВГЧ-6 19,5% против 13,6%) выделяют ДНК вирусов и, напротив, у детей с контролируемой БА достоверно чаще (63,6% против 51,2%) ДНК вирусов не обнаруживают. У больных с обнаруженной ДНК ВЭБ установлены более высокие уровни IL-5 и общего IgE — 0,91 пг/мл и 184,5 МЕ, с ДНК ВГЧ-6 — 0,29 пг/мл и 113,1 МЕ и с ДНК обоих возбудителей — 0,25 пг/мл и 371,7 МЕ соответственно по сравнению с пациентами, у которых генетический материал вирусов не определялся (IL-5 — 0,11 пг/мл и общий IgE — 95,2 МЕ). В то же время у пациентов с детектированной ДНК исследуемых вирусов отмечен более низкий уровень ОФВ1: при наличии ДНК ВЭБ — 96,6%, ВГЧ-6 — 98,8%, обоих вирусов — 106,2% против 109,8% у пациентов без обнару-

Адрес для переписки:

Супрун Евгений Николаевич
680022, Россия, г. Хабаровск, ул. Воронежская, 49,
НИИ охраны материнства и детства.
Тел.: 8 914 772-76-85. Факс: 8 (4212) 70-05-91.
E-mail: evg-suprun@yandex.ru

Contacts:

Evgeniy N. Suprun
680022, Russian Federation, Khabarovsk, Voronezhskaya str., 49,
Research Institute of Maternity and Childhood Protection.
Phone: +7 914 772-76-85. Fax: +7 (4212) 70-05-91.
E-mail: evg-suprun@yandex.ru

Для цитирования:

Супрун Е.Н., Супрун С.В., Власова М.А., Кудерова Н.И., Евсеева Г.П.,
Лебедько О.А. Влияние активации вируса Эпштейна–Барр и вируса
герпеса человека 6 типа на течение и контроль бронхиальной астмы
у детей Приамурья // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1175–
1180. doi: 10.15789/2220-7619-AIO-2006

Citation:

Suprun E.N., Suprun S.V., Vlasova M.A., Kuderova N.I., Evseeva G.P.,
Lebed'ko O.A. An impact of activated Epstein–Barr virus and HHV-6
on the course and control of bronchial asthma in children of the Amur
region // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet,
2022, vol. 12, no. 6, pp. 1175–1180. doi: 10.15789/2220-7619-AIO-2006

женной ДНК ВЭБ и ВГЧ-6. Пациенты с обнаруженной ДНК ВЭБ и ВГЧ-6 требуют более высоких доз ТГКС для достижения контроля над заболеванием: 325,0 и 186,4 мкг соответственно, а в случае выявления ДНК обоих вирусов — 328,1 мкг против 198,6 мкг у пациентов, у которых ДНК вирусов не обнаруживалась. Таким образом, активация как ВЭБ, так и ВГЧ-6 ухудшает контроль бронхиальной астмы и утяжеляет ее течение, однако именно ВЭБ имеет более выраженное влияние на течение заболевания и контроль над ним.

Ключевые слова: ВЭБ, ВГЧ-6, бронхиальная астма, дети, иммунный статус, контролируемое течение.

AN IMPACT OF ACTIVATED EPSTEIN–BARR VIRUS AND HHV-6 ON THE COURSE AND CONTROL OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN OF THE AMUR REGION

Suprun E.N.^{a,b}, Suprun S.V.^a, Vlasova M.A.^a, Kuderova N.I.^a, Evseeva G.P.^a, Lebed'ko O.A.^a

^a Khabarovsk Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration — Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk, Russian Federation

^b Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation

Abstract. The role of viral infection in bronchial asthma (BA) is well-known being reflected particularly in GINA. An effect of pneumotropic intracellular persistent herpesviruses on the course of BA is of particular interest. The most common viruses of this group are cytomegalovirus (CMV), Epstein–Barr virus (EBV), and human herpesvirus 6 (HHV-6). The CMV role has been discussed in our previous publications allowing us to focus here on EBV and HHV-6. We examined 167 children with BA that was diagnosed and clinically assessed in accordance with the current national clinical guidelines. Patients with controlled asthma (70 patients), partially controlled and uncontrolled asthma (97 patients) were stratified into several groups. The detection of EBV and HHV-6 DNA was carried out in throat swabs by PCR; the level of total and virus-specific IgA, IgM, IgG, IgE as well as serum level of IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-8 and TNF α was assessed by enzyme linked immunosorbent assay; lymphocyte subpopulations were analyzed by flow cytometry. The dose of topic GCS was taken into account with reference to the fluticasone equivalent; the function of external respiration was studied by spirometry. It was revealed that EBV DNA was found in 14.2% of cases, whereas HHV-6 — in 19.0% of cases, but 14.4% and 52.4% of patients, respectively, shed no pathogen-linked DNA. At the same time, patients with uncontrolled BA are significantly more likely to shed the pathogen DNA, so that EBV is released in 17.1% vs 4.5% of patients with controlled BA, HHV-6 — in 19.5% vs 13.6%. On the contrary, children with controlled BA were significantly more often (63.6% vs 51.2%) negative for viral DNA shedding. Moreover, virus shedding was paralleled with higher levels of IL-5: it was as high as 0.91 pg/ml and 0.29 pg/ml for EBV and HHV-6, respectively; those shedding DNA of both pathogens vs no shedding had IL-5 at level of 0.25 pg/ml vs 0.11 pg/ml. Similar pattern was observed for higher total IgE: 184.5 IU for EBV, 113.1 IU — for HHV-6, and 371.7 IU —shedding both viruses vs 95.2 IU in without DNA pathogen shedding; lower level of FEV1: EBV — 96.6%, HHV-6 — 98.8%, and 106.2% in patients shedding both viruses vs 109.8% in patients not shedding the pathogen DNA. Patients shedding EBV DNA require higher doses of topic GCS to achieve disease control: EBV — 325.0 μ g, HHV-6 — 186.4 μ g; shedding both viruses — 328.1 μ g of topic GCS vs 198.6 μ g in patients without pathogen DNA shedding. Thus, activation of both EBV and HHV-6 worsens BA control and aggravates its course, but EBV persistence has a more pronounced effect on the course and control of the disease.

Key words: EBV, HHV-6, asthma, children, immune status, controlled flow.

Роль вирусной инфекции при бронхиальной астме (БА) давно известна, отражена в международных согласительных документах, в том числе Global Initiative for Asthma (GINA) последних редакций [8]. Периодически появляются новые обобщающие работы по этой проблеме [9]. Однако особый интерес представляет влияние на развитие и течение БА персистирующих вирусов группы герпеса. Они длительное время, часто пожизненно, персистируют в слизистой бронхов и неизбежно принимают участие в патоморфозе БА [2]. Наиболее распространенными из них являются цитомегаловирус (ЦМВ, ВГЧ-5 или CMV, HHV-5), вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ, ВГЧ-4 или EBV, HHV-4) и вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6 или HHV-6). В ряде исследований у детей, страдающих БА,

инфицированных вирусами герпеса, выявлены достоверные различия в интерлейкиновом профиле в сравнении с пациентами, не выделяющими ДНК возбудителей, в частности более высокое содержания TNF α , IL-1, IL-2, IL-4 и IL-10, и более низкое IL-6 и IL-8 [5]. Показана большая встречаемость ВЭБ у детей с бронхиальной астмой [10]. Подтверждена частота выделения ДНК вируса именно в бронхиальном эпителии у больных с БА в сравнении с лицами, не страдающими БА, что свидетельствует о его активном размножении в органе мишени — бронхах [7]. Установлена положительная взаимозависимость между активацией ВЭБ и уровнем иммуноглобулина Е у детей с БА [6]. Роль ВГЧ-6 в патогенезе БА в доступной литературе отражена намного слабее, встречаются лишь

единичные статьи, касающиеся этой темы, где выдвигается тезис о протективной роли персистенции этого вируса. В этих исследованиях показано, что воздействие ВГЧ-6 значительно ингибировало выработку IL-4, IL-5 и IL-3 в лаважной жидкости и в легочной ткани, подвергшейся воздействию вируса при бронхиальной астме в модели на мышах [11]. Роль цитомегаловируса рассматривалась в наших предыдущих работах [3, 4], поэтому данное исследование посвящено ВЭБ и ВГЧ-6.

Целью настоящего исследования было изучение влияния активации ВЭБ и ВГЧ-6 в эпителии дыхательных путей на контролируемость и течение БА у детей Приамурья.

Материалы и методы

Работа проведена на базе клиники (педиатрическое и консультативно-диагностическое отделение) и лаборатории комплексных методов исследований бронхолегочной и перинатальной патологии Хабаровского филиала ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательского института охраны материнства и детства в период с 2017 по 2021 г. Обследовано 167 детей, страдающих БА в возрасте от 1 до 17 лет, проживающих в Дальневосточном федеральном округе (Хабаровский край, Еврейская автономная область, Амурская область); из них 54,1% горожане, 45,9% проживают в сельской местности; средний возраст детей составил $7,3 \pm 1,6$ года; 55,4% обследованных составили мальчики, 44,6% — девочки; у 40,3% детей имела место легкая степень БА, у 47,5% — БА средней тяжести и у 12,2% — тяжелая; средний астматический стаж на момент поступления по данным анамнеза составил $42 \pm 7,1$ месяцев. Критериями включения являлись: подтверждение диагноза БА, наличие доказательства ее атопического генеза — сенсибилизация к респираторным аллергенам; критериями исключения — наличие иной бронхолегочной патологии, острых инфекционных заболеваний на момент обследования. В результате были сформированы две группы пациентов: с контролируемым (70 пациентов), частично контролируемым и неконтролируемым течением БА (97 пациентов) согласно критериям Клинических рекомендаций [1].

Оценка требуемой для обеспечения контроля дозы топического глюкокортикостероида (ТГКС) проводилась по флутиказону с пересчетом иных препаратов по уровню биоэквивалентности.

Определение ДНК ВЭБ и ВГЧ-6 типа проводилось методом ПЦР с использованием для выделения ДНК и амплификации наборов

НПФ «Литех» (Россия), учет продуктов амплификации проводился методом электрофореза в агарозном геле. Для определения уровней IgA, IgM, IgG, IgE (общего и специфических), IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-18 и TNF α в сыворотке крови применяли иммуноферментный метод с использованием тест-систем «Вектор-Бест» (Россия), определение проводилось посредством автоматического спектрофотометра Lazurite (Dy nex Technologies Inc., США). Исследование лимфоидных популяций осуществляли на цитометре FACSCalibur с панелью моноклональных антител (Becton Dickinson, США).

При статистическом анализе результатов исследования использовались стандартные методы вариантной статистики с применением пакета программ Statistica 10.0 для Windows. Проверка на нормальность распределения статистических показателей проводилась с использованием критерия Колмогорова—Смирнова. В настоящей работе значения представлены в виде $M \pm m$ — средней \pm стандартная ошибка средней (SD/\sqrt{n}) = SEM (Standard Error Means, где n — объем выборки). Проверку статистической гипотезы равенства групповых средних проводили по t-критерию Стьюдента (двухвыборочный t-критерий). Кроме того, оценивалась достоверная разница долей в группах. При описании достоверности результатов статистического анализа было использовано выражение « $p < 0,05$ ».

Исследования проводились в соответствии с принципами текущего пересмотра Хельсинкской декларации (64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October, 2013). Все манипуляции проводились с персонального добровольного информированного согласия обследованных и/или их законных представителей, во всех таблицах статистической обработки, кроме первичной, пациенты представлены под порядковыми номерами. Электронная таблица Excel с первичными данными хранилась под защитой пароля и была доступна только участникам исследования. Дизайн исследования утвержден этическим комитетом ХФ ДНЦ ФПД — НИИ Омид, протокол № 5 от 14.05.2017.

Результаты и обсуждение

При исследовании мазков из зева ДНК ВЭБ была выявлена у 14,2% больных с БА, ДНК ВГЧ-6 — у 9,0%, ДНК обоих возбудителей — у 14,4%, соответственно у 52,4% пациентов ДНК вирусов обнаружена не была (рис.).

При анализе распространенности выделения ДНК вирусов в группах с контролируемой и неконтролируемой астмой получены следующие результаты (табл. 1).

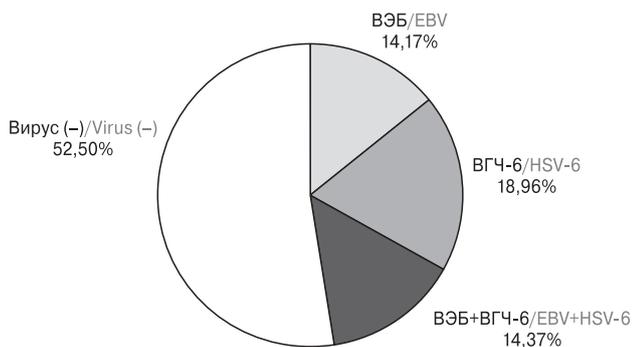


Рисунок. Частота обнаружения ДНК вирусов группы герпеса в мазках из зева у детей с БА

Figure. Frequency of detected herpesvirus DNA in pharyngeal swabs in BA children

У пациентов с контролируемой БА достоверно чаще (63,6 против 51,2%) ДНК вирусов не определяется, и, напротив, у больных с неконтролируемой астмой достоверно чаще (17,1 против 4,5%) обнаруживается ДНК ВЭБ, и есть четко выраженная тенденция к более частому (19,5 против 13,6%) выделению ДНК ВГЧ-6. Четких различий между указанными группами больных в одномоментном выделении ДНК обоих вирусов нет.

При оценке клинико-иммунологических показателей у детей с БА в зависимости от выделения ДНК вирусов были получены статистически различающиеся результаты (табл. 2).

Так, уровень IL-5, во многом определяющего atopическое воспаление, был достоверно

выше у детей с обнаруженной ДНК ВЭБ в сравнении с пациентами без выявленной ДНК ВЭБ (0,91 пг/мл против 0,11 пг/мл), тенденция к повышению этого показателя есть и у детей с ДНК ВГЧ-6 — 0,29 пг/мл и с обнаруженным генетическим материалом обоих вирусов — 0,25 пг/мл. У детей с положительным тестом на ДНК исследуемых вирусов выше как абсолютное, так и относительное содержание В-лимфоцитов, непосредственно вырабатывающих IgE: достоверно выше у детей с активацией ВЭБ — 506,7 и 19% против 398,7 и 15,1% соответственно у пациентов без активации; с активацией ВГЧ-6 — 489,7 и 16,4%; у выделяющих оба вируса имеет место тенденция той же направленности — 426,0 и 16,5%. У пациентов с активацией вирусов выше и уровень IgE, непосредственно инициирующего atopическое воспаление в тканях-мишенях: достоверно выше у позитивных на ДНК ВЭБ — 184,5 МЕ и на ДНК обоих вирусов — 371,7 МЕ (против 95,2 МЕ у ДНК-негативных), и тенденция той же направленности у больных с активацией ВГЧ-6 — 113,1 МЕ. Следует отметить, что больные, у которых выявляется ДНК обоих вирусов, имеют достоверно более высокий уровень IgE в сравнении с пациентами всех остальных групп, а позитивные на ДНК ВЭБ — не только в сравнении с теми пациентами, у которых ДНК вирусов не обнаруживалась, но и с позитивными на ДНК ВГЧ-6.

При анализе клинических показателей выявлено достоверное снижение объема форсированного выдоха в первую секунду (ОФВ1) у пациентов, положительных только на ДНК ВЭБ и только на ДНК ВГЧ-6, в сравнении с пациентами без активации вирусов — 96,6 и 98,8% от должностяующего против 109,8% соответственно. Отмечена тенденция к снижению ОФВ1 у ДНК-позитивных на оба вируса одновременно (106,2%).

Дети, позитивные на ДНК ВЭБ, нуждаются в получении достоверно более высоких доз ТГКС в сравнении с пациентами с невыявленной ДНК ВЭБ — 325 мкг против 198,6 мкг соответственно. Также получение более высоких доз ТГКС показано на фоне совместной активации ВЭБ с вирусом ВГЧ-6 — 328,1 мкг. В то же время дозировка ТГКС для пациентов, положительных только на ДНК ВГЧ-6, составляла 186,4 мкг в сутки и достоверно не отличалась от таковой для больных, у которых ДНК вирусов не была обнаружена. Дети с БА, с положительным результатом обследования на ДНК ВЭБ и ВГЧ-6, достоверно более часто, чем пациенты без активации вирусов, нуждаются в комбинированной терапии: позитивные на ДНК ВЭБ — в 100%, ВГЧ-6 — в 83,4%, ВЭБ+ВГЧ-6 — в 88,8%, пациенты, у которых ДНК вирусов обнаружена не была, — лишь в 66,1%.

Таблица 1. Выделение ДНК ВЭБ и ВГЧ-6 (%) из зева у детей с контролируемой и неконтролируемой БА

Table 1. Isolation of EBV and HHV-6 DNA (%) from the pharynx in children with controlled and uncontrolled BA

	Контролируемая Controlled n = 70	Неконтролируемая Uncontrolled n = 97	Достоверность Significance
Вирус (-) Virus (-)	63,6	51,2	0,049
ВЭБ EBV	4,5	17,1	0,01
ВГЧ-6 HHV-6	13,6	19,5	0,14
ВЭБ+ВГЧ-6 EBV+HHV-6	13,6	12,3	0,42

Таблица 2. Клинико-иммунологические показатели у детей с БА в зависимости от выделения ДНК ВЭБ и ВГЧ-6

Table 2. Clinical and immunological parameters of BA children related to isolated EBV and HHV-6 DNA

	Вирус (-) Virus (-) n = 88	ВЭБ EBV n = 23	ВГЧ-6 HHV-6 n = 32	ВЭБ+ВГЧ-6 EBV+HHV-6 n = 24
IL-5, pg/ml	0,11±0,07	0,91±0,08*	0,29±0,19	0,25±0,23
CD19, абс./abs.	398,7±23,7	506,7±54,0*	489,7±60,2*	426,0±64,4
CD19, %	15,1±0,53	19,0±2,26**	16,4±1,44	16,5±2,17
IgE, ME	95,2±8,3	184,5±21,1* °	113,1±18,7#	371,7±31,8* # °
ОФВ1, % FEV1, %	109,8±2,5	96,6±6,9*	98,8±5,45*	106,2±3,23
ТГКС, мкг/сут TGCS, mg/day	198,6±25,9	325,0±68,2*	186,4±27,9#	328,1±78,1* °
Комбинированная терапия, % Combined therapy, %	66,1	100*	83,4* #	88,8* #

Примечание. Достоверность различий: * — с группой вирус (-), $p \leq 0,05$; ** — с группой вирус (-), $p \leq 0,01$; # — с группой ВЭБ; ° — с группой ВГЧ-6.
Note. The significance of differences: * — with the virus (-) group, $p \leq 0,05$, ** — with the virus (-) group, $p \leq 0,01$; # — with the VEB group, ° — with the HHV-6 group.

Заключение

Полученные нами данные показывают влияние активации ВЭБ и ВГЧ-6 в эпителии дыхательных путей на иммунопатогенез и течение БА. У больных с неконтролируемой астмой достоверно чаще (более чем в 3 раза для ВЭБ и в 1,5 раза для ВГЧ-6 типа) обнаруживают ДНК вирусов в мазках из зева. У детей с положительным результатом обследования на присутствие

ДНК ВЭБ и ВГЧ-6 более высокий (для ВЭБ в 9 раз, для ВГЧ-6 в 3 раза) уровень IL-5, также более высокий (для ВЭБ в 2 раза) уровень IgE и достоверно более низкий уровень ОФВ1. Пациенты с выявленной ДНК ВЭБ требуют на 40% более высоких доз ТГКС для достижения контроля над заболеванием. Таким образом, оба вируса ухудшают течение и контроль БА, но ВЭБ имеет более выраженное влияние на течение заболевания и его контроль.

Список литературы/References

1. Бронхиальная астма: клинические рекомендации. Министерство здравоохранения РФ, 2019. [Bronchial asthma: clinical recommendations. Ministry of Health of the Russian Federation, 2019] URL: http://spulmo.ru/upload/kr_bronhastma_2019.pdf
2. Конищева, А.Ю., Гервазиева В.Б. Вирусы семейства Herpesviridae и аутореактивность у больных бронхиальной астмой // Российский иммунологический журнал. 2019. Т. 22, № 2-1. С. 320–322. [Konishcheva A.Y., Gervazieva V.B. Viral infections from herpesviridae family and autoreactivity in bronchial asthma. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, vol. 22, no. 2-1, pp. 320–322. (In Russ.)] doi: 10.31857/S102872210006614-0
3. Супрун Е.Н., Козлов В.К., Морозова О.И., Ефименко М.В. Влияние персистенции цитомегаловируса на течение бронхиальной астмы у детей // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 3. С. 201–206. [Suprun E.N., Kozlov V.K., Morozova O.I., Efimenko M.V. Influence of cytomegalovirus persistence upon clinical course of bronchial asthma (BA) in children. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 3, pp. 201–206. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-201-206
4. Супрун Е.Н., Козлов В.К. Обоснование необходимости целенаправленной терапии цитомегаловируса у детей с бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. 2013. Т. 5, № 3. С. 269–276. [Suprun E.N., Kozlov V.K. Rationale for a specific therapy of cytomegalovirus infection in children with bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, vol. 15, no. 3, pp. 269–276. (In Russ.)]
5. Чернышева О.Е. Клинико-иммунологические особенности бронхиальной астмы у детей, протекающей на фоне персистирующих внутриклеточных инфекций // Здоровье ребенка. 2015. № 1 (60). С. 69–76. [Chernyshova O.E. Clinical and immunological features of bronchial asthma in children on the background of persistent intracellular infections. *Zdorov'e rebenka = Child's Health*, 2015, no. 1 (60), pp. 69–76. (In Russ.)]
6. Al-Hamadany A. Estimation of serum immunoglobulin E level in asthma and its correlation with Epstein–Barr Virus (EBV) infection. *Tikrit Journal of Pure Science*, 2018, vol. 23, no. 9, pp. 12–15. doi: 10.25130/tjps.23.2018.143
7. Choi S., Sohn K.H., Jung J.W., Kang M.G., Yang M.S., Kim S., Choi J.H., Cho S.H., Kang H.R., Yi H. Lung virome: New potential biomarkers for asthma severity and exacerbation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, vol. 148, no. 4, pp. 1007–1015. doi: 10.1016/j.jaci.2021.03.017
8. Global initiative for Asthma. Global strategy for Asthma Management and Prevention 2020. URL: https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-full-report_-final-_wms.pdf (14.04.2022)
9. Jartti T.K., Bønnelykke V., Feleszko W. Role of viruses in asthma. *Semin. Immunopathol.*, 2020, vol. 42, no. 1, pp. 61–74. doi: 10.1007/s00281-020-00781-5

10. Konishcheva, A., Gervazieva V. Immunological features of active herpesviral infection in bronchial asthma. *Eur. Resp. J.*, 2018, vol. 52, no. 62: PA4470. doi: 10.1183/13993003.congress-2018.PA4470
11. Svensson A., Almqvist N., Chandy A.G. Exposure to human herpes virus type 6 protects against allergic asthma in mice. *Journal of Allergy & Therapy*, 2010, vol. 1, iss. 1: 1000101. doi: 10.4172/2155-6121.1000101

Авторы:

Супрун Е.Н., к.м.н., врач аллерголог-иммунолог, старший научный сотрудник группы медико-экологических проблем здоровья матери и ребенка лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства (Хабаровский филиал ДНЦ ФПД — НИИОМид), г. Хабаровск, Россия; доцент кафедры госпитальной и факультетской педиатрии с курсом пропедевтики детских болезней; ФГБОУ ВО Дальневосточный государственный медицинский университет, г. Хабаровск, Россия;

Супрун С.В., д.м.н., главный научный сотрудник группы медико-экологических проблем здоровья матери и ребенка лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, Хабаровский филиал ДНЦ ФПД — НИИОМид, г. Хабаровск, Россия;

Власова М.А., к.м.н., старший научный сотрудник группы молекулярно-генетической диагностики лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, Хабаровский филиал ДНЦ ФПД — НИИОМид, г. Хабаровск, Россия;

Кудерова Н.И., научный сотрудник группы клинической иммунологии и эндокринологии лаборатории комплексных методов исследования бронхо-легочной и перинатальной патологии, Хабаровский филиал ДНЦ ФПД — НИИОМид, г. Хабаровск, Россия;

Евсеева Г.П., д.м.н., руководитель группы медико-экологических проблем здоровья матери и ребенка лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, Хабаровский филиал ДНЦ ФПД — НИИОМид, г. Хабаровск, Россия;

Лебедько О.А., д.м.н., директор, зав. лабораторией комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, Хабаровский филиал ДНЦ ФПД — НИИОМид, г. Хабаровск, Россия.

Authors:

Suprun E.N., PhD (Medicine), Allergist-Immunologist, Senior Researcher, Group of Health and Environmental Problems of Mother and Child Health, Khabarovsk Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration — Research Institute of Maternity and Childhood Protection (Khabarovsk Branch of FESC PPR — RI MCP), Khabarovsk, Russian Federation; Associate Professor, Department of Hospital and Faculty Pediatrics with a Course of Propaedeutics of Children's Diseases, Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation;

Suprun S.V., PhD, MD (Medicine), Head Researcher, Group of Health and Environmental Problems of Mother and Child Health, Khabarovsk Branch of FESC PPR — RI MCP, Khabarovsk, Russian Federation;

Vlasova M.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Molecular Genetic Diagnosis Group, Laboratory of Integral Methods of Bronchopulmonary and Perinatal Pathology Research, Khabarovsk Branch of FESC PPR — RI MCP, Khabarovsk, Russian Federation;

Kuderova N.I., Researcher, Group of Clinical Immunology and Endocrinology, Laboratory of Integral Methods of Bronchopulmonary and Perinatal Pathology Research Khabarovsk Branch of FESC PPR — RI MCP, Khabarovsk, Russian Federation;

Evseeva G.P., PhD, MD (Medicine), Head of the Group of Health and Environmental Problems of Mother and Child Health, Khabarovsk Branch of FESC PPR — RI MCP, Khabarovsk, Russian Federation;

Lebed'ko O.A., PhD, MD (Medicine), Director, Head of the Laboratory of Integral Methods of Bronchopulmonary and Perinatal Pathology Research, Khabarovsk Branch of FESC PPR — RI MCP, Khabarovsk, Russian Federation.

ПОЛОСТЬ РТА КАК ЛОКУС ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ГЕТЕРОГЕННОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ

О.В. Кондратенко, М.С. Сабурова

ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия

Резюме. Муковисцидоз является важной медико-социальной проблемой. Несмотря на значительные успехи современной науки и практики, бактериальные осложнения по-прежнему остаются одной из основных причин летальности пациентов. Одним из значимых возбудителей бактериальной инфекции при муковисцидозе является *Pseudomonas aeruginosa*, способная приводить к быстрому снижению легочной функции. В то же время нижние дыхательные пути — это не единственный локус для микробной колонизации. Показана роль параназальных синусов как очага для первичного попадания и последующей адаптации клинически значимых при муковисцидозе патогенов. Полость рта также может служить резервуаром для первичного попадания и адаптации штаммов. Однако этому посвящены лишь единичные исследования. В сообщении приводится описание клинического случая выделения гетерогенной микробной популяции *P. aeruginosa* из различных локусов полости рта и мокроты пациента с муковисцидозом. При этом выделенные из полости рта и мокроты штаммы различались по своим культуральным свойствам и антибиотикорезистентности. Выполнен протеомный анализ масс-спектров 11 изолятов и их сопоставление между собой и контрольным штаммом *P. aeruginosa* ATCC 27853 с визуализацией с помощью CCI-матрицы. В результате проведенного анализа выявлен высокий уровень гетерогенности исследуемой популяции, при этом лишь для отдельных пар изолятов получены высокие значения CCI Score. Показано, что штаммы, выделенные из мокроты пациента, оказались более однородными по белковым профилям, чем культуры, выявленные с различных участков слизистой оболочки полости рта. При этом в случае выделения нескольких морфотипов *P. aeruginosa* из одного локуса в полости рта близкородственных штаммов выделено не было. Показано, что полость рта является более значимой с точки зрения микробной диссоциации при муковисцидозе, что может быть обусловлено более разнообразными микроэкологическими условиями. Представители микробиологического сообщества посредством микроаспирации могут реколонизировать трахеобронхиальное дерево, тем самым способствуя поддержанию инфекционного воспаления в нижних дыхательных путях и частично объясняя неэффективность небулайзерной антибактериальной терапии. В то же время и клоны, адаптировавшиеся в легочной ткани при откашливании мокроты способны реколонизировать локусы полости рта. Полученные данные актуализируют вопрос о необходимости комплексного микробиологического подхода при проведении обследования пациентов для повышения эффективности эрадикационных мероприятий при муковисцидозе.

Ключевые слова: муковисцидоз, полость рта, мокрота, синегнойная инфекция, масс-спектрометрия, гетерогенность.

Адрес для переписки:

Кондратенко Ольга Владимировна
443079, Россия, г. Самара, ул. Гагарина, 18,
Самарский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (846) 374-10-04, доб. 4574.
E-mail: o.v.kondratenko@samsmu.ru

Contacts:

Olga V. Kondratenko
443079, Russian Federation, Samara, Gagarin str., 18,
Samara State Medical University.
Phone: +7 (846) 374-10-04, add. 4574.
E-mail: o.v.kondratenko@samsmu.ru

Для цитирования:

Кондратенко О.В., Сабурова М.С. Полость рта как локус для формирования гетерогенной бактериальной популяции у пациентов с муковисцидозом // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1181–1185. doi: 10.15789/2220-7619-TOC-1992

Citation:

Kondratenko O.V., Saburova M.S. The oral cavity as a site for developing a heterogeneous bacterial population in patients with cystic fibrosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1181–1185. doi: 10.15789/2220-7619-TOC-1992

THE ORAL CAVITY AS A SITE FOR DEVELOPING A HETEROGENEOUS BACTERIAL POPULATION IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

Kondratenko O.V., Saburova M.S.

Samara State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Samara, Russian Federation

Abstract. Cystic fibrosis is an important medical and social problem. Despite significant advances in modern science and practice, bacterial complications are still among the main causes of patient mortality. One of the crucial bacterial pathogens in cystic fibrosis is *Pseudomonas aeruginosa*, which can lead to rapidly decreased pulmonary function. At the same time, the lungs are not the only site for microbial colonization. The oral cavity can also serve as a reservoir for initial entry and adaptation of microbial strains, which, however, were only sparsely investigated. A clinical case of isolated heterogeneous microbial population of *P. aeruginosa* from various loci of the oral cavity and sputum of a patient with cystic fibrosis is described. A proteomic mass-spectrum analysis obtained from eleven isolates as well as their mutual comparison with the control strain of *P. aeruginosa* ATCC 27853 visualized with CCI matrix was performed. As a result, a high level of heterogeneity of the studied population was revealed, while high CCI Score values were obtained only for individual pairs of isolates. It was shown that the bacterial strains isolated from the patient sputum turned out to be more homogeneous in protein profiles than cultures detected from various oral sites. At the same time, in case of isolated several morphotypes of *P. aeruginosa* from single oral site, no closely related strains were found. Thus, it is shown that the oral cavity is more important viewed from microbial dissociation in cystic fibrosis, which may be due to more diverse microecological conditions. Representatives of the microbiological community can recolonize the tracheobronchial tree through microaspiration, thereby contributing to the maintenance of infectious inflammation in the lower respiratory tract and partially accounting for ineffectiveness of nebulized antibacterial therapy. At the same time, clones adapted to the lung tissue upon coughing up sputum are able to colonize oral sites. The data obtained actualize the question of the need for a comprehensive microbiological approach while examining patients to increase effectiveness of eradication measures in cystic fibrosis.

Key words: cystic fibrosis, oral cavity, sputum, *Pseudomonas aeruginosa* infection, mass-spectrometry, heterogeneity.

Введение

Муковисцидоз — самое распространенное аутосомно-рецессивное генетически детерминированное заболевание. В последние десятилетия продолжительность и качество жизни больных значительно возросли, что позволило ему выйти далеко за рамки педиатрической патологии. В связи с оптимизацией проводимой терапии и ранней диагностики в России и мире отмечается увеличение доли подростков и взрослых пациентов с муковисцидозом, что, в свою очередь, раскрывает перед врачами новые аспекты осложнений этого заболевания. По-прежнему одной из основных причин ранней летальности являются бактериальные осложнения бронхолегочной системы [1]. На сегодняшний день хорошо известен вклад основных бактериальных патогенов, имеющих ключевое значение при муковисцидозе, в частности инфекции, ассоциированной с *Pseudomonas aeruginosa* [2]. Но легкие это не единственный биотоп для колонизации. Многочисленными исследованиями показана роль параназальных синусов как локуса для первичного попадания и последующей адаптации штаммов [43]. В то же время, описанию потенциальной роли полости рта в качестве резервуара для бактериальной микрофлоры посвящены лишь единичные публикации [3]. Необходимость и значимость регулярного стоматологического и микробиологического обследования полости рта не регламентирована действующими рекомендациями. Исходя из этого, вероятная

роль полости рта как локуса для адаптации и последующей диверсификации клинически значимых патогенов не учитывается при оказании медицинской помощи пациентам с муковисцидозом. Это может быть одним из ключевых факторов, объясняющих неэффективность стандартных схем антисинегнойной эрадикационной терапии. В качестве иллюстрации этого феномена нами приводится описание результатов клинко-микробиологического обследования пациента с муковисцидозом, имеющего интермиттирующие высевы синегнойной инфекции из легких в анамнезе на протяжении жизни.

Материалы и методы

Пациент А., 2007 г. рожд., мужчина. При проведении планового стоматологического обследования не выявлено патологии, полость рта санирована. Во время осмотра у пациента был произведен забор проб биоматериала из восьми локусов полости рта. Стерильными пластиковыми зондами с ватным тампоном вращательным движением собирался материал с поверхности слизистой оболочки щеки и с поверхности спинки языка; с щечной поверхности первых моляров верхней челюсти и язычной поверхности центральных резцов нижней челюсти стоматологическим скалером было произведено снятие минерализованных и неминерализованных зубных отложений; выделенный из выводных протоков правых и левых околоушных и подъязычных слюнных желез секрет

собирались стерильными пластиковыми зондами; эндодонтическим бумажным штифтом размера 15.02 производился сбор десневой жидкости. Все собранные пробы биоматериала были помещены в предварительно промаркированные пробирки с жидкой тиогликолевой средой и доставлены в изотермических условиях в лабораторию в течение 20 мин после сбора.

В лаборатории посев каждой пробы осуществлялся на следующие питательные среды: на поверхность двух чашек с 5% кровяным агаром с дефибрированной бараньей кровью (HiMedia, Индия), двух чашек с универсальной хромогенной средой (BioRad, США), чашек с селективной средой для *Burkholderia cepacia* (OFPBL-агар) с бацитрацином и полимиксина сульфатом (HiMedia, Индия), Veilonella-агаром (HiMedia, Индия), агаром для анаэробов (HiMedia, Индия), Clostridium-агаром (HiMedia, Индия), агаром для лактобактерий (HiMedia, Индия), агаром для бифидобактерий (HiMedia, Индия) с использованием техники посева «штрихом». На поверхность чашек с агаром Сабуро с хлорамфениколом производился посев гомогенизированного материала методом бляшек с последующей инкубацией при 28°C до 14 сут с ежедневными просмотрами посевов. Затем по одной засеянной чашке с 5% кровяным агаром с дефибрированной бараньей кровью и с универсальной хромогенной средой, а также чашка с селективной средой для *Burkholderia cepacia* (OFPBL-агар) с бацитрацином и полимиксина сульфатом инкубировались в термостате при температуре 37°C в течение 24–48 ч с ежедневным просмотром посевов. При этом засеянные чашки с селективной средой для *Burkholderia cepacia* (OFPBL-агар) с бацитрацином и полимиксина сульфатом инкубировались в аэробных условиях 24–48 ч при температуре 37°C, далее инкубировались до 14 сут при температуре 28°C с ежедневным просмотром посевов. По одной засеянной чашке с 5% кровяным агаром с дефибрированной бараньей кровью и с универсальной хромогенной средой, а также чашки с Veilonella-агаром, агаром для анаэробов, Clostridium-агаром, агаром для лактобактерий, агаром для бифидобактерий инкубировались в анаэробных условиях 96–120 ч при температуре 37°C.

Идентификация выделенных штаммов производилась с помощью MALDI-ToF масс-спектрометра (Bruker, Германия). Со штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из локусов полости рта, а также параллельно из мокроты пациента были сняты белковые спектры методом экстракции муравьиной кислотой. Последующая визуализация протеомного сопоставления полученных масс-спектров проводилась с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 (Bruker, Германия).

В отношении исследуемых штаммов был проведен расчет составного индекса корреляции (Composite Correlation Index — CCI).

Результаты и обсуждение

В результате проведенного микробиологического исследования у пациента из полости рта было выделено 34 штамма микроорганизмов, среди которых были представители пародонтопатогенных бактерий, в частности *Actinomyces odontolyticus* («пурпурный» пародонтопатогенный комплекс), *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* («желтый» пародонтопатогенный комплекс), что оценивается как фактор риска по развитию заболеваний пародонта в дальнейшем.

Кроме этого, был получен рост девяти штаммов *P. aeruginosa* в посевах из пяти локусов — с поверхности десневой борозды (штамм № 2), устья протоков правых подъязычной (штаммы № 7 и № 8) и околоушной слюнных желез (штамм № 6), поверхности языка (штаммы № 11 и № 12) и слизистой оболочки щек (штаммы № 9 и № 10). В мокроте пациента был получен рост гетерогенной популяции *P. aeruginosa*, включающей в себя мукоидный штамм (штамм № 4), чувствительный ко всем тестируемым препаратам; немучоидный штамм (штамм № 3), с изолированной устойчивостью к имипенему; а также штамм с морфотипом мелких колоний (штамм № 5), чувствительный ко всем тестируемым препаратам. Штамм, выделенный с поверхности десневой борозды, был мукоидным и сохранял чувствительность ко всем антибиотикам. С устья протока подъязычной слюнной железы выделена гетерогенная популяция возбудителя в виде смеси чувствительного мукоидного беспигментного морфотипа и немучоидного пигментированного клона. Со слизистой оболочки языка также выделена смесь колониальных морфотипов чувствительного беспигментного мукоидного и немучоидного, с изолированной устойчивостью к ципрофлоксацину. Со слизистой оболочки щеки также получена морфологически однородная смесь двух мукоидных морфотипов с гетерорезистентностью к имипенему.

Учитывая широкий спектр выделенных клонов, демонстрирующих как морфологические различия, так и отличающихся по антибиотикорезистентности, нами было проведен анализ однородности культур на основании белковых профилей (масс-спектров). Было выполнено сопоставление имеющихся масс-спектров с применением статистических расчетов с последующей визуализацией в виде CCI-матрицы (рис., вклейка, с. II). При использовании указанного метода возможно выявление степени совпадения штаммов от полной идентичности

Таблица. Характеристика штаммов *P. aeruginosa*, использованных для построения CCI-матрицыTable. Characteristics of the *P. aeruginosa* strains used to construct the CCI-matrix

Номер штамма Strain number	Описание штамма <i>P. aeruginosa</i> и локуса его выделения Description of the <i>P. aeruginosa</i> strain and relevant site of isolation
1	Контрольный штамм <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Control strain of <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
2	Немукоидный штамм, выделенный с поверхности десневой борозды A non-mucoid strain isolated from the surface of the gingival crest
3	Немукоидный штамм с изолированной устойчивостью к имипенему, выделенный из мокроты A sputum non-mucoid strain with isolated imipenem resistance
4	Мукоидный штамм, выделенный из мокроты Mucoid strain isolated from sputum
5	Немукоидный штамм с морфотипом мелких колоний, выделенный из мокроты A non-mucoid strain with the morphotype of small colonies isolated from sputum
6	Немукоидный штамм, выделенный из устья правой околоушной слюной железы A non-mucoid strain isolated from orifice of the right parotid salivary gland
7	Мукоидный штамм, выделенный из устья правой подъязычной слюной железы Mucoid strain isolated from orifice of the right sublingual salivary gland
8	Немукоидный штамм, выделенный из устья правой подъязычной слюной железы A non-mucoid strain isolated from orifice of the right sublingual salivary gland
9	Немукоидный штамм, выделенный со слизистой оболочки щеки A non-mucoid strain isolated from the cheek mucosa
10	Немукоидный штамм, выделенный со слизистой оболочки щеки с изолированной устойчивостью к имипенему A non-mucoid strain obtained from cheek mucosa with isolated imipenem resistance
11	Немукоидный штамм, выделенный с поверхности языка с изолированной устойчивостью к ципрофлоксацину A non-mucoid strain obtained from the surface of the tongue with isolated ciprofloxacin resistance
12	Мукоидный штамм, выделенный с поверхности языка Mucoid strain isolated from the surface of the tongue

(темно-красный цвет) до отсутствия совпадения (синий цвет). Значение CCI Score может находиться в пределах значений от 0 до 1, при этом 0 определяется как полное отсутствие совпадений, а 1 — полное совпадение или идентичность штаммов. Информация о номерах штаммов, взятых в анализ, представлена в таблице. Пары штаммов с показателями CCI Score более 0,800 расценивались как близкородственные в соответствии с рекомендациями производителя программного обеспечения.

В результате проведенного исследования показано, что в полости рта пациента сформировано гетерогенное бактериальное сообщество, что подтверждается результатами сравнения масс-спектров при построении и анализе CCI-матрицы в виде «тепловой карты».

При анализе масс-спектров культур, выделенных из мокроты, были получены следующие результаты. Штамм № 4 имеет близкое родство с другими штаммами, выделенными из мокроты, однако между штаммами № 3 и № 5 уровень родства оказался ниже 0,800, что позволяет предположить, их формирование и адаптацию в различных микроэкологических условиях.

Штаммы, выделенные из одного локуса слизистой оболочки полости рта, оказались гетерогенными по масс-спектрам. Попарные значения

CCI Score для мукоидного (штамм № 7) и немучоидного (штамм № 8) штаммов, выделенных из устья правой подъязычной слюной железы; для двух немучоидных штаммов (штаммы № 9 и № 10), выделенных со слизистой оболочки щеки, а также мукоидного (штамм № 12) и немучоидного (штамм № 11) штаммов, выделенных с поверхности языка, оказались ниже 0,800.

При сравнении штаммов, выделенных из мокроты со штаммами из полости рта, были выявлены следующие закономерности: штамм № 3 на основании сравнений масс-спектров оказался родственным со штаммами, выделенными из устья правой околоушной слюной железы (штамм № 6) и с языка (штамм № 12). Штамм № 4, выделенный из мокроты близок по масс-спектрам со штаммами, выделенными с поверхности языка (№ 11 и № 12). Штамм № 5, выделенный из мокроты, близок по масс-спектрам к штаммам, выделенным с поверхности десневой борозды (штамм № 2), немучоидными штаммами, выделенными из устья правой подъязычной слюной железы (штамм № 8) и с поверхности языка (штамм № 11).

Наиболее отличающимся по своим масс-спектрам оказался 9 изолят, не имеющий совпадений по масс-спектрам не только от выделенных из мокроты, но и из локусов полости рта штаммов.

Таким образом выявлен высокий уровень гетерогенности исследуемой популяции, при этом только для отдельных пар изолятов выявлен высокий уровень значений CCI Score.

Заключение

Полость рта пациентов с муковисцидозом может быть одним из локусов для первичного попадания, адаптации и последующего формирования гетерогенной популяции бактерий, имеющих доказанное клиническое значение при данной патологии. Представители микробиологического сообщества посредством микроаспирации могут реколонизировать трахеобронхиальное дерево, тем самым способствуя поддержанию инфекционного воспаления в нижних дыхательных путях и частично объясняя неэффективность небулайзерной антибактериальной терапии. В то же время и клоны,

адаптировавшиеся в легочной ткани, при откашливании мокроты способны реколонизировать локусы полости рта.

Было показано, что штаммы, выделенные из мокроты, оказались более однородными, чем культуры, выявленные со слизистой оболочки полости рта. При этом в случае выделения нескольких морфотипов *P. aeruginosa* из одного локуса в полости рта, близкородственных штаммов выделено не было. Таким образом полость рта является более значимой с точки зрения микробной диссоциации, что может быть обусловлено более разнообразными микроэкологическими условиями. Полученные данные актуализируют вопрос о необходимости комплексного микробиологического подхода при проведении обследования пациентов для повышения эффективности эрадикационных мероприятий при муковисцидозе, что следует учитывать клиницистам и микробиологам в своей практической деятельности.

Список литературы/References

1. Красовский С.А., Амелина Е.Л., Каширская Н.Ю., Воронкова А.Ю., Зоненко О.Г. Динамика показателей национального регистра больных муковисцидозом за 2011–2017 года // Сибирское медицинское обозрение. 2019. № 2 (116). С. 14–18. [Krasovsky S.A., Amelina E.L., Kashirskaya N.Yu., Voronkova A.Yu., Zonenko O.G. Dynamics of indicators of the national register of patients with cystic fibrosis for 2011–2017. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2019, no. 2 (116), pp. 14–18. (In Russ.) doi: 10.20333/2500136-2019-2-14-18]
2. Сиянова Е.А., Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Шагинян И.А., Прилипов А.Г., Усачев Е.В., Кондратьева Е.И., Припутневич Т.В., Гордеев А.Б., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И., Ильенкова Н.А., Красовский С.А., Шерман В.Д., Воронкова А.Ю., Амелина Е.Л., Усачева М.В. Мониторинг хронической инфекции легких у больных муковисцидозом, вызванной бактериями *Pseudomonas aeruginosa* // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2018. Т. 97, № 2. С. 77–86. [Syanova E.A., Chernukha M.Yu., Avetisyan L.R., Shaginyan I.A., Prilipov A.G., Usachev E.V., Kondratieva E.I., Priputnevich T.V., Gordeev A.B., Kashirskaya N.Yu., Kapranov N.I., Ilyenkova N.A., Krasovsky S.A., Sherman V.D., Voronkova A.Yu., Amelina E.L., Usacheva M.V. Monitoring of chronic lung infection in patients with cystic fibrosis caused by *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. The journal named after G.N. Speransky*, 2018, vol. 97, no. 2, pp. 77–86. (In Russ.)]
3. Coffey N., O'Leary F., Burke F., Roberts A., Hayes M. Periodontal and oral health status of people with cystic fibrosis: a systematic review. *J. Dent.*, 2020, vol. 103: 103509. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103509
4. Hansen S.K., Rau M.H., Johansen H.K., Ciofu O., Jelsbak L., Yang L., Folkesson A., Jarred H.O., Aanaes K., von Buchwald C., Hoiby N., Molin S. Evolution and diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in paranasal sinuses of cystic fibrosis children have implications for chronic lung infection. *ISME J.*, 2012, vol. 6, no. 1, pp. 31–45. doi: 10.1038/ismej.2011.83

Авторы:

Кондратенко О.В., д.м.н., доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Сабурова М.С., ассистент кафедры терапевтической стоматологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия.

Authors:

Kondratenko O.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Saburova M.S., Assistant Professor, Department of Therapeutic Dentistry, Samara State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Samara, Russian Federation.

Поступила в редакцию 29.06.2022
Принята к печати 18.08.2022

Received 29.06.2022
Accepted 18.08.2022

ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ В ИММУНОДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА

В.П. Мудров^{1,2}

¹ ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия

² ГБУ Диагностический клинический центр № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

Резюме. Искусственный интеллект используется для диагностики различных заболеваний полости рта. В области клинической лабораторной диагностики алгоритмы машинного обучения применяются в интерпретации сложных биохимических данных. Точную диагностическую информацию о пародонтите можно получить при создании комбинации соответствующих биомаркеров с необходимой чувствительностью и специфичностью. Целью настоящего исследования стал поиск значимых инфекционно-иммунологических клинико-лабораторных данных на основе алгоритма машинного обучения при хроническом пародонтите. Для этого обследовано 124 пациента в возрасте от 40 до 70 лет с диагнозом «Хронический пародонтит», которым методом ПЦР в реальном времени провели исследование кармана пародонта на ДНК вирусов герпеса человека и бактериальную пародонтопатогенную микрофлору *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*. Также изучались матричные РНК провоспалительных цитокинов и другие маркеры хронизации воспалительного процесса: IL-1 β , IL-10, IL-18, TNF α , TLR4, GATA3, CD68. В пробе зубодесневой жидкости определяли TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-18, VEGF. Иммунные клетки ротовой полости оценивали по содержанию CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD64⁺CD16⁺CD14⁻, Treg CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, T-NK CD3⁺CD16⁺CD56⁺, NK CD3⁻CD16⁺CD56⁺, CD14⁺, CD14⁺HLA-DR⁺, CD19⁺, CD19⁺HLA-DR⁺, B1 CD19⁺CD5⁺B27⁻, B2 CD19⁺CD5⁻B27⁻, CD19⁺CD5⁻B27⁺. Для оценки данных использовалось машинное обучение «random forest». Была выявлена связь между патогенной микрофлорой и характером иммунного ответа. Преобладал провоспалительный компонент, выраженный в экспрессии мРНК IL-1 β , TNF α , IFN γ в иммунном ответе на агрессивные пародонтопатогены: *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* и др. Алгоритм машинного обучения «random forest» выбрал из множества данных корреляционные отношения $r \geq 0,5$ (как положительные, так и отрицательные) для проведения дальнейшего анализа оператором. Модель машинного обучения «random forest» на 10% с учителем показала следующие значимые сочетания данных: VEGF, CD3⁺, CD14⁺HLA-DR, CD19⁺CD5⁻CD27⁺, а также мРНК TLR4, IL-1 β , IL-10, TNF α , IL-18. Развитие примененной модели «random forest» машинного обучения с учителем уже на 25% показала отличия: *P. endodontalis*, GATA3, CD3⁺, CD14⁺, CD19⁺CD5⁻CD27⁺, а также мРНК TLR4, TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-18. Поиск значимых инфекционно-иммунологических клинико-лабораторных данных на основе алгоритма машинного обучения при хроническом пародонтите показал значимость в развитии остеодеструктивного воспалительного процесса мРНК провоспалительных цитокинов, моноцитов, Т-лимфоцитов

Адрес для переписки:

Мудров Валерий Павлович
125284, Россия, Москва, ул. Поликарпова, 1/10,
кафедра медицинской биохимии и иммунопатологии РМАНПО.
Тел.: 8 916 174-44-77 (моб.).
E-mail: vpmudrov@yandex.ru

Contacts:

Valery P. Mudrov
125284, Russian Federation, Moscow, Polikarpova str., 1/10,
Department of Medical Biochemistry and Immunopathology,
Russian Medical Academy of Continuous Professional Education.
Phone: +7 916 174-44-77 (mobile).
E-mail: vpmudrov@yandex.ru

Для цитирования:

Мудров В.П. Искусственный интеллект в иммунодиагностике хронического пародонтита // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1186–1190. doi: 10.15789/2220-7619-AII-1999

Citation:

Mudrov V.P. Artificial intelligence in the immunodiagnosics of chronic periodontitis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1186–1190. doi: 10.15789/2220-7619-AII-1999

и В-клеток памяти. Для поиска взаимосвязей инфекционного иммунопатологического процесса может применяться машинное обучение с учителем на базе модели «random forest», что позволяет статистически обрабатывать большие массивы данных и выявлять неявные причинно-следственные факторы.

Ключевые слова: машинное обучение, random forest, иммунодиагностика, иммунные клетки, мРНК цитокинов, хронический пародонит.

ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN THE IMMUNODIAGNOSTICS OF CHRONIC PERIODONTITIS

Mudrov V.P.^{a,b}

^a Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

^b Diagnostic Clinical Center No. 1 of the Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation

Abstract. Artificial intelligence is used to diagnose various diseases of the oral cavity. In the field of clinical laboratory diagnostics, machine learning algorithms are used in the interpretation of complex biochemical data. The purpose of this study was to search for significant infectious-immunological clinical and laboratory data based on a machine learning algorithm for chronic periodontitis. To do this, 124 patients aged 40 to 70 years diagnosed with chronic periodontitis were examined by real-time PCR to detect the periodontal pocket DNA of human herpes viruses and bacterial periodontopathogenic microflora *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas endodontalis* etc., and *Porphyromonas gingivalis*. Matrix RNAs of proinflammatory cytokines and other markers of chronic inflammatory process were also studied: IL-1 β , IL-10, IL-18, TNF α , TLR4, GATA3, CD68. TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-18; VEGF were determined in a den-toalveolar fluid. Immune cells of the oral cavity were evaluated by analyzing level of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD64⁺16⁺14⁻, CD4⁺25⁺127^{low}, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁻CD16⁺CD56⁺, CD14⁺, CD14⁺HLA-DR⁺, CD19⁺HLA-DR⁺, CD19⁺CD5⁺B27⁻, CD19⁺CD5⁻B27⁻, CD19⁺CD5⁻B27⁺ cells. Random forest machine learning was used to evaluate the data. A relationship between pathogenic microflora and modality of immune response was revealed. The proinflammatory component reflected in the expression of IL-1 β , TNF α , and IFN γ mRNA, prevailed in the immune response against aggressive periodontal pathogens: *T. denticola*, *F. nucleatum*, etc. The random forest machine learning algorithm selected correlation ratios $r \geq 0.5$ (both positive and negative) from a set of data for further analysis by the operator. The random forest machine learning model showed the following significant combinations of data by 10% with a teacher: VEGF, CD3⁺, CD14⁺HLA-DR, CD19⁺CD5⁻CD27⁺, as well as TLR4, IL-1 β , IL-10, TNF α , and IL-18 mRNA. The development of the applied “random forest” machine learning model with a teacher has already shown a 25% difference: *P. endodontalis*, GATA3, CD3⁺, CD14⁺, CD19⁺CD5⁻CD27⁺, as well as TLR4, TNF α , IL-1 β , IL-10, and IL-18 mRNA. The search for significant infectious-immunological clinical and laboratory data based on a machine learning algorithm for chronic periodontitis has shown the importance of proinflammatory cytokines, monocytes, T-lymphocytes and memory B-cells in the development of osteodestructive inflammatory process of mRNA to reveal non-evident causality factors.

Key words: machine learning, random forest, immunodiagnostics, immune cells, cytokine mRNA, chronic periodontitis.

Введение

Заболевания пародонта поражают более миллиарда человек во всем мире, разрушая альвеолярную кость и приводя к потере зубов. Искусственный интеллект используется для диагностики различных заболеваний полости рта, таких как кариес, заболевания верхнечелюстных пазух, пародонта, слюнных желез, рак полости рта, с помощью клинических данных и диагностических изображений. Ранняя диагностика заболеваний пародонта с использованием искусственного интеллекта (ИИ) может улучшить стоматологический статус пациента и улучшить его общее состояние здоровья и качество жизни [7].

В современной стоматологии модели ИИ были разработаны для диагностики гингивита, заболеваний пародонта, но прецизионность этих технологий остается неясной. Для выявления и классификации заболеваний пародонта это: машины опорных векторов, дерева решений, сверточные нейросети, глубокое обучение и др. Так модели ис-

кусственного интеллекта для постановки диагноза при обнаружении зубного налета дают точность от 73,6 до 99%; диагностика гингивита по интраоральным фотографиям 74–78,2%; эффективность выявления потери альвеолярной кости по рентгенографическим изображениям составляет 73,4–99%, глубокое обучение по запаху изо рта — точность прогноза патологии до 97% [2].

В области клинической лабораторной диагностики алгоритмы машинного обучения включают проверку качества результатов лабораторных исследований, автоматизированный анализ осадка мочи, прогнозирование заболевания или исхода по обычным лабораторным параметрам и интерпретацию сложных биохимических данных [6].

Субстратом для работы искусственного интеллекта являются анализ 16s рРНК слюны пациента. В качестве опорных данных также используются гемоглобин, витамин В12, ферритин, уровень фолиевой кислоты, частота чистки зубов и многое другое [1].

Пародонтит в его острой и хронической формах представляет собой широко распространенную воспалительную патологию полости рта. Непрерывное прогрессирование такой патологии приводит к разрушению всех поддерживающих пародонт тканей, включая альвеолярную кость, десну и периодонтальные связки вокруг зуба, и пародонтит является наиболее распространенной причиной потери зубов у взрослых. Такое быстро развивающееся новое направление исследований как нейронные сети дало впечатляющие результаты с точки зрения диагностики и прогнозирования в рентгенологических и гистопатологических исследованиях [4].

Машинное обучение подходит для прогнозирования на основе таких сложных данных, как анализ микробиоты полости рта человека, состоящей из более 700 известных видов бактерий [5]. К основным группам потенциальных маркеров пародонтита относятся: маркеры воспаления, маркеры разрушения соединительной ткани и маркеры ремоделирования костной ткани [3].

На сегодняшний день основные мутации генов, приводящие к формированию фенотипа пародонтита у системно здоровых людей, не идентифицированы, а специфический генетический фактор риска заболевания не выявлен. Точную диагностическую информацию о пародонтите можно получить при создании комбинации соответствующих биомаркеров с необходимой чувствительностью и специфичностью.

Целью настоящего исследования был поиск значимых инфекционно-иммунологических клиничко-лабораторных данных на основе алгоритма машинного обучения при хроническом пародонтите.

Материалы и методы

На базе 4 Университетской клинической больницы Первого МГМУ им. И.М. Сеченова обследовано 124 пациента в возрасте от 40 до 70 лет с диагнозом «Хронический пародонтит». Оценка состояния пародонта проводилась по стандартным клиническим критериям, включавшим в себя подвижность зубов, размер зубодесневого кармана. После проведения осмотра и оценки состояния пародонта пациентам брали биологическую пробу зубо-десневой жидкости, помещая эндодонтический целлюлозный штафт № 30 в пародонтальный карман на 60 с и переносили в 1 мл стерильного 0,9% изотонического раствора NaCl. Для проведения исследования клеточного состава мукозальной иммунной системы проводили полоскание ротовой полости 50 мл стерильного изотонического раствора 0,9% NaCl.

Методом ПЦР в реальном времени оценивали ДНК вирусов герпеса человека и пародонтопатогенную микрофлору *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* (ООО НПФ «Литех», Россия). Также изучались матричные РНК провоспалительных цитокинов: IL-1 β , IL-10, IL-18, TNF α , TLR4, GATA3, CD68 (ООО «ДНК-Технология», Россия). В пробе зубодесневой жидкости определяли фактор некроза опухоли- α (TNF α), интерферон- γ (IFN γ), интерлейкины 1 β , 4, 6, 10, 18 (IL), фактор роста эндотелия сосудов человека (VEGF) (АО «Вектор-Бест», Россия). Иммунные клетки ротовой полости оценивали по содержанию CD3 $^+$, CD4 $^+$, CD8 $^+$, Такт.CD3 $^+$ HLA-DR $^+$, CD64 $^+$ CD16 $^+$ CD14 $^-$, Treg CD4 $^+$ CD25 $^+$ CD127 low , T-NK CD3 $^+$ CD16 $^+$ CD56 $^+$, NK CD3 $^-$ CD16 $^+$ CD56 $^+$, CD14 $^+$, CD14 $^+$ HLA-DR $^+$, CD19 $^+$, CD19 $^+$ HLA-DR $^+$, В1 CD19 $^+$ CD5 $^+$ B27 $^-$, B2 CD19 $^+$ CD5 $^-$ B27 $^-$, Впам CD19 $^+$ CD5 $^-$ B27 $^+$ в смешанной слюне. Для анализа концентрации, размера и жизнеспособности клеток в образце проводили подсчет клеток на автоматическом счетчике клеток TC20 (Bio-Rad Laboratories, США). Проточную цитометрию проводили на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США; РЗН 2018/6733) с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft, США). В качестве критерия достоверности использовали статистический критерий Манна–Уитни, а также Краскела–Уоллиса ($p < 0,05$). Корреляцию данных оценивали по критерию Спирмена. Для алгоритма машинного обучения «random forest» с обучением на 10 и 25% все данные были деидентифицированы.

Результаты и обсуждение

Результаты и обсуждение

По результатам проведенных исследований была сформирована тепловая матрица отношений из 2630 полученных пар данных. В их числе оказались тяжесть пародонтита и возраст ($r = 0,515$), возраст и глубина кармана пародонта ($r = 0,621$), IL-18 и подвижность зуба ($r = 0,5$), мРНК IL-1 β и *P. intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* и VEGF ($r = 0,57$), мРНК IL-10 и *Fusobacterium nucleatum* ($r = 0,69$) и др. Были установлены статистически достоверные корреляционные взаимосвязи содержания бактерий *F. nucleatum* со всеми изученными пародонтопатогенами, но особенно сильная корреляция отмечалась между *F. nucleatum* и *P. gingivalis* ($r = 0,641$) и *T. denticola* при средней ($r = 0,607$). Преобладает провоспалительный компонент, выраженный в экспрессии мРНК IL-1 β , TNF α , IFN γ в иммунном ответе на агрессивные пародонтопатогены *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* и др.

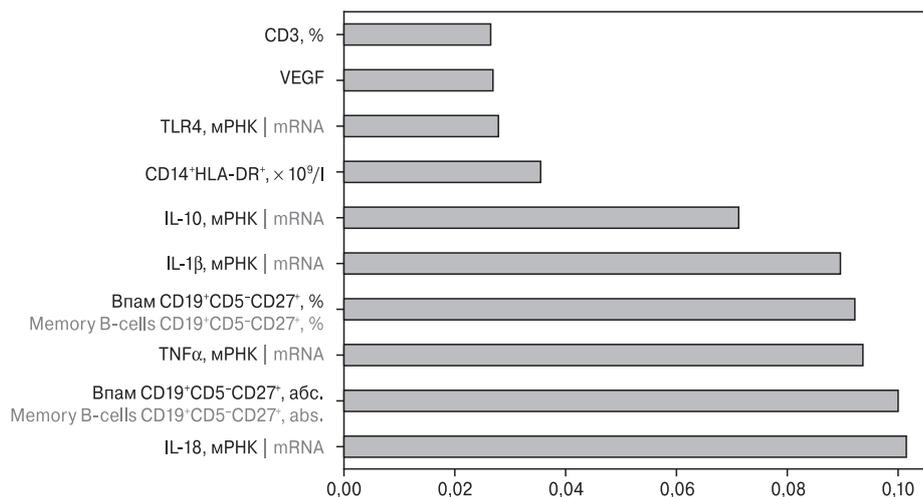


Рисунок 1. Значимые параметры хронического пародонтита по результатам «машинного обучения» при обучении с учителем на 10%

Figure 1. Significant parameters of chronic periodontitis according to the results of “machine learning” when learning with a teacher by 10%

Алгоритм машинного обучения «random forest» выбрал из множества данных корреляционные отношения $r \geq 0,5$ (как положительные, так и отрицательные) для проведения дальнейшего анализа оператором. Модель машинного обучения «random forest» на 10% с учителем показала следующие значимые сочетания данных (рис. 1): VEGF, CD3⁺, CD14⁺HLA-DR, CD19⁺CD5⁻CD27⁺, а также мРНК TLR4, IL-1β, IL-10, TNFα, IL-18.

Как показано, при таком подходе к оценке данных значимыми становятся соотношения клеток иммунной системы и мРНК цитокинов.

Развитие примененной модели «random forest» машинного обучения с учителем уже на 25% показала отличия (рис. 2): *P. endodontalis*,

GATA3, CD3⁺, CD14⁺, CD19⁺CD5⁻CD27⁺, а также мРНК TLR4, TNFα, IL-1β, IL-10, IL-18.

Результаты показывают, что при анализе большого массива данных недостаточно привычного статистического аппарата, показывающего очевидные результаты и скрывающего неявные связи параметров. Искусственный интеллект помогает преодолеть проблему получения результата из малого объема биообразца, так как в этом случае мы анализируем не количественные, а соотносительные характеристики микроорганизмов и реакции иммунной системы на локальном участке кармана пародонта.

В результате, значимость параметров хотя и различна по значимости и составу показателей, использование алгоритма «random forest»

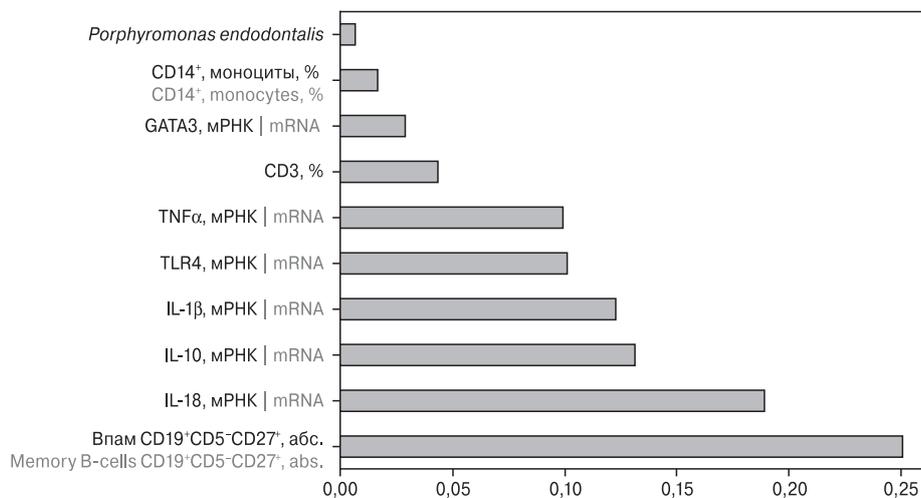


Рисунок 2. Значимые параметры хронического пародонтита по результатам «машинного обучения» при обучении с учителем на 25%

Figure 2. Significant parameters of chronic periodontitis according to the results of “machine learning” when learning with a teacher by 25%

с обучением позволяет избежать ошибки переобучения при использовании «глубокого обучения», что может дать не объективные, а желаемые результаты.

Работа показывает возможность выбора необходимых лабораторных данных для клинической лабораторной диагностики, а использование ИИ в современной стоматологии путем извлечения значимой информации из больших объемов медицинских данных может применяться для поддержки клинического решения. Область ИИ быстро развивается, чтобы заполнить постоянно расширяющуюся нишу в медицине и стоматологии. Большинство исследований в области ИИ все еще находятся на начальной стадии. Повышение доступности данных о пациентах может ускорить исследования в области искусственного интеллекта, машинного обучения и нейронных сетей. Рост искусственного интеллекта в стоматологической помощи произведет революцию в стоматологии и откроет более широкий доступ к стоматологической медицинской помощи с лучшими результатами для пациентов.

Выводы

В результате анализа клинических и лабораторных данных с помощью алгоритма машинного обучения ИИ было подтверждено, что

существуют различные связи между характером заболевания и клинико-лабораторными данными.

Поиск значимых инфекционно-иммунологических клинико-лабораторных данных на основе алгоритма машинного обучения при хроническом пародонтите показал значимость в развитии остеодеструктивного воспалительного процесса мРНК провоспалительных цитокинов, моноцитов, Т-лимфоцитов и В-клеток памяти.

Для поиска взаимосвязей инфекционного иммунопатологического процесса может применяться машинное обучение с учителем на базе модели «random forest», что позволяет статистически обрабатывать большие массивы данных и выявлять неявные причинно-следственные факторы.

Благодарности

Автор выражает свою признательность Иванову С.Ю., Мяндиёву М.С. и Фоменкову И.С. (Первый МГМУ им. И.М. Сеченова), Мураеву А.А. (РУДН) за помощь в организации и сборе биоматериала, Милие Йовичичу (Белградский университет) за существенную помощь в разработке модели машинного обучения, Казакову С.П. (ГВКГ им. Н.Н. Бурденко, РМАНПО) за критические замечания в процессе исследования.

Список литературы/References

1. Cabitza F., Banfi G. Machine learning in laboratory medicine: waiting for the flood? *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2018, vol. 56, no. 4, pp. 516–524. doi: 10.1515/cclm-2017-0287
2. De Bruyne S., Speeckaert M.M., Van Biesen W., Delanghe J.R. Recent evolutions of machine learning applications in clinical laboratory medicine. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2021, vol. 58, no. 2, pp. 131–152. doi: 10.1080/10408363.2020.1828811
3. Lee J.-H., Kim D.-H., Jeong S.-N., Choi S.-H. Diagnosis and prediction of periodontally compromised teeth using a deep learning-based convolutional neural network algorithm. *J. Periodontal. Implant. Sci.*, 2018, vol. 48, no. 2, pp. 114–123. doi: 10.5051/jpis.2018.48.2.114
4. Mupparapu M., Wu C.W., Chen Y.C. Artificial intelligence, machine learning, neural networks, and deep learning: futuristic concepts for new dental diagnosis. *Quintessence Int.*, 2018, vol. 49, no. 9, pp. 687–688. doi: 10.3290/j.qi.a41107
5. Nakano Y., Suzuki N., Kuwata F. Predicting oral malodour based on the microbiota in saliva samples using a deep learning approach. *BMC Oral Health*, 2018, vol. 18, pp. 128–135. doi: 10.1186/s12903-018-0591-6
6. Patil S., Albogami S., Hosmani J., Mujoo S., Kamil M.A., Mansour M.A., Abdul H.N., Bhandi S., Ahmed S.S.S.J. Artificial intelligence in the diagnosis of oral diseases: applications and pitfalls. *Diagnostics (Basel)*, 2022, vol. 12, no. 5: 1029. doi: 10.3390/diagnostics12051029
7. Revilla-León M., Gómez-Polo M., Barmak A.B., Inam W., Kan J.Y.K., Kois J.C., Akal O. Artificial intelligence models for diagnosing gingivitis and periodontal disease: a systematic review. *J. Prosthet. Dent.*, 2022, S0022-3913(22)00075-0. doi: 10.1016/j.prosdent.2022.01.026

Автор:

Мудров В.П., к.м.н., ассистент кафедры медицинской биохимии и иммунопатологии академического образовательного центра фундаментальной и трансляционной медицины (АОЦФТМ) Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования (РМАНПО), Москва, Россия; врач клинической лабораторной диагностики ГБУ Диагностический клинический центр № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия.

Author:

Mudrov V.P., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Medical Biochemistry and Immunopathology, Academic Educational Center for Fundamental and Translational Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation; Pathologist, Diagnostic Clinical Center No. 1 of the Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.07.2022
Принята к печати 18.08.2022

Received 17.07.2022
Accepted 18.08.2022

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС- СИНДРОМА ПРИ КОНКУРИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ: COVID-19 И САРКОИДОЗ

О.В. Воробьева, Н.Е. Гималдинова, Л.П. Романова

ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия

Резюме. Пандемия COVID-19 является проблемой мирового масштаба. Клинический спектр инфицирования SARS-CoV-2 варьирует от бессимптомных или малосимптомных форм до таких состояний, как пневмония, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) и полиорганная недостаточность. В статье приведено описание клинического случая инфицирования SARS-CoV-2 на фоне саркоидоза легких и сердечно-сосудистой патологии с развитием ОРДС и отека легких. *Материалы и методы.* Проведен анализ полученной сопроводительной медицинской документации (амбулаторная карта пациента, история болезни), клинко-морфологический анализ (описание макро- и микропрепаратов). *Результаты.* При гистологическом исследовании в легких выявлялись признаки диффузного альвеолярного повреждения в виде гиалиновых мембран, выстилающих и повторяющих контуры стенок альвеол. В стенках альвеол выявляются участки некроза, десквамация альвеолярного эпителия в виде разрозненных клеток или пластов, кровоизлияния и гемосидерофаги. В просвете альвеол определялся слущенный эпителий с геморрагическим компонентом, немногочисленные многоядерные клетки, макрофаги, белковые массы, скопление отечной жидкости. Легочные сосуды умеренно полнокровные, окружены периваскулярными инфильтратами. Выявлялись признаки саркоидоза легких. При гистологическом исследовании определялись эпителиоидно-клеточные гранулемы, состоящие из мононуклеарных фагоцитов и лимфоцитов, без признаков некроза. Определялись гранулемы с пролиферативным компонентом, с участками кровоизлияний. Выявлялись гигантские клетки с цитоплазматическими включениями — астероидные тельца и тельца Шаумана. В лимфатических узлах корней легких определялись неказеозные гранулемы, состоящие из скоплений эпителиоидных гистиоцитов и гигантских клеток Лангханса, окруженных лимфоцитами. В зонах периферических синусов лимфоузлов внутри гигантских клеток встречались тельца Хамазаки–Везенберга. В просвете бронхов обнаружен тотально слущенный эпителий, слизь. На слизистой оболочке, преимущественно субэндотелиально, определяются гранулемы, без казеозного некроза. При гистологическом исследовании сердца выявлялась фрагментация некоторых кардиомиоцитов, очаговая гипертрофия кардиомиоцитов с умеренным межклеточным отеком, эритроцитарными сладжами, определялись зоны мелкоочагового склероза. Сосуды микроциркуляторного русла — малокровные, с гипертрофией стенок мелких артерий и артериол. При вирусологическом исследовании секционного материала в легких обнаружена РНК SARS-CoV-2. *Заключение.* Из данных медицинской документации и результатов

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Для цитирования:

Воробьева О.В., Гималдинова Н.Е., Романова Л.П.
Патоморфологические признаки острого респираторного дистресс-
синдрома при конкурирующих заболеваниях легких: COVID-19
и саркоидоз // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1191–1196.
doi: 10.15789/2220-7619-PFO-1872

Citation:

Vorobeva O.V., Gimaldinova N.E., Romanova L.P. Pathomorphological
features of acute respiratory distress syndrome in competing lung
diseases: COVID-19 and sarcoidosis // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1191–1196.
doi: 10.15789/2220-7619-PFO-1872

патологоанатомического исследования следует, что причиной смерти больного Р.А., 50 лет стала новая коронавирусная инфекция COVID-19, вызвавшая двухстороннюю тотальную вирусную пневмонию. Наличие конкурирующих болезней, таких как саркоидоз легких и сердечно-сосудистые заболевания, усугубили течение болезни, привели к развитию раннего ОРДС и, в конечном итоге, к летальному исходу.

Ключевые слова: COVID-19, саркоидоз легких, пневмония, гипертензия, острый респираторный дистресс-синдром, гранулемы.

PATHOMORPHOLOGICAL FEATURES OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME IN COMPETING LUNG DISEASES: COVID-19 AND SARCOIDOSIS

Vorobeva O.V., Gimaldinova N.E., Romanova L.P.

Chuvash State University named after I.N. Ulyanova, Cheboksary, Russian Federation

Abstract. The COVID-19 pandemic is a worldwide problem. The clinical spectrum of SARS-CoV-2 infection varies from asymptomatic or paucity-symptomatic forms to conditions such as pneumonia, acute respiratory distress syndrome and multiple organ failure. Objective was to describe a clinical case of SARS-CoV-2 infection in the patient with sarcoidosis and cardiovascular pathology developing acute respiratory syndrome and lung edema. *Material and methods.* There were analyzed accompanying medical documentation (outpatient chart, medical history), clinical and morphological histology data (description of macro- and micro-preparations) using hematoxylin and eosin staining. *Results.* Lung histological examination revealed signs of diffuse alveolar damage such as hyaline membranes lining and following the contours of the alveolar walls. Areas of necrosis and desquamation of the alveolar epithelium in the form of scattered cells or layers, areas of hemorrhages and hemosiderophages are detected in the alveolar walls. In the lumen of the alveoli, a sloughed epithelium with a hemorrhagic component, few multinucleated cells, macrophages, protein masses, and accumulated edematous fluid were determined. Pulmonary vessels are moderately full-blooded, surrounded by perivascular infiltrates. Signs of lung sarcoidosis were revealed. Histological examination found epithelioid cell granulomas consisting of mononuclear phagocytes and lymphocytes, without signs of necrosis. Granulomas with a proliferative component and hemorrhage sites were determined. Giant cells with cytoplasmic inclusions were detected — asteroid corpuscles and Schauman corpuscles. Non-caseous granulomas consisting of clusters of epithelioid histiocytes and giant Langhans cells surrounded by lymphocytes were detected in the lymph nodes of the lung roots. Hamazaki–Wesenberg corpuscles inside giant cells were found in the zones of peripheral sinuses of lymph nodes. In the lumen of the bronchi, there was found fully exfoliated epithelium, mucus. Granulomas are mainly observed subendothelially on the mucous membrane, without caseous necrosis. Histological examination of the cardiovascular system revealed fragmentation of some cardiomyocytes, cardiomyocyte focal hypertrophy along with moderate interstitial edema, erythrocyte sludge. Zones of small focal sclerosis were determined. The vessels of the microcirculatory bed are anemic, with hypertrophy of the walls in small arteries and arterioles. Virological examination of the sectional material in the lungs revealed SARS-CoV-2 RNA. *Conclusion.* Based on the data of medical documentation and the results of a post-mortem examination, it follows that the cause of death of the patient R.A., 50 years old, was a new coronavirus infection COVID-19 that resulted in bilateral total viral pneumonia. Co-morbidity with competing diseases such as lung sarcoidosis and cardiovascular diseases aggravated the disease course, led to the development of early ARDS and affected the lethal outcome.

Key words: COVID-19, pulmonary sarcoidosis, pneumonia, hypertension, acute respiratory distress syndrome, granulomas.

Введение

Саркоидоз — мультисистемный гранулематоз неизвестной этиологии, характеризующийся образованием в органах и тканях неказеифицирующих эпителиоидно-клеточных гранул [5]. Распространенность саркоидоза в Российской Федерации колеблется от 22 до 47 человек на 100 тыс. населения. В последние десятилетия отмечается рост заболеваемости саркоидозом [6]. Это вероятно связано, с одной стороны, с истинным возрастанием его частоты, с другой — с усовершенствованием методов диагностики и активным выявлением [1, 2]. Помимо поражения легких, возможно поражение кожи, глаз, сердца и опорно-двигательного аппарата [5]. Чаще всего (более 90% случаев) изменения возникают в легких и во внутригруд-

ных лимфатических узлах. Легочный саркоидоз начинается с поражения альвеолярной ткани и сопровождается развитием интерстициального пневмонита с последующим образованием саркоидных гранул в субплевральной и перибронхиальной тканях, а также в междолевых бороздах [2]. Морфологическим субстратом саркоидоза является наличие гранул из эпителиоидных и гигантских клеток. При внешнем сходстве с туберкулезными гранулемами, для саркоидных узелков нехарактерно развитие казеозного некроза и наличие в них микобактерий туберкулеза. Очаги гранулематозных скоплений в каком-либо органе нарушают его функцию и приводят к появлению соответствующих симптомов. При сдавлении лимфатическими узлами стенок бронхов возможны обструктивные нарушения, а иногда и развитие

зон гиповентиляции и ателектазов. Сочетание вирусной инфекции и саркоидоза с сердечно-сосудистыми заболеваниями, несмотря на проводимые лечебные мероприятия, способствуют раннему развитию острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) взрослых, некардиоогенному отеку легких и летальному исходу. Основными патофизиологическими механизмами, способствующими развитию ОРДС, являются нарушение регуляции воспаления и повышение проницаемости капилляров микроциркуляторного русла легких. При воспалении микробные продукты или эндогенные молекулы связываются с Toll-подобными рецепторами в эпителии легких и альвеолярных макрофагах и активируют местную иммунную систему. Происходит образование внеклеточных ловушек нейтрофильных клеток (NET-механизм), которые, с одной стороны, распознают и поглощают патогены, а с другой — повреждают стенку альвеол. Вырабатываемые при этом фактор некроза опухоли- α (TNF α), фактор роста эндотелия сосудов дестабилизируют связи VE-кадгерина, повышают проницаемость эндотелия и способствуют накоплению альвеолярной жидкости (некардиоогенному отеку легких). Поскольку саркоидоз является заболеванием, которое влияет на иммунную систему, такие пациенты находятся в группе риска не только по инфицированию SARS-CoV-2, но и раннему развитию ОРДС. В связи с несомненной актуальностью данной проблемы, в статье приведено описание клинического случая инфицирования SARS-CoV-2 на фоне саркоидоза легких и сердечно-сосудистой патологии.

Материалы и методы

Проведен анализ полученной сопроводительной медицинской документации (амбулаторная карта пациента, история болезни), клинико-морфологический анализ (описание макро- и микропрепаратов) с использованием окраски микропрепаратов гематоксилином и эозином.

Результаты

Больной Р.А., 1971 г. рожд., находился в Бюджетном учреждении «Больница скорой медицинской помощи» в течение 3-х дней. Был экстренно госпитализирован в диагностическое отделение стационара в связи с жалобами на одышку, чувство нехватки воздуха, повышение температуры тела до 38,4°C. На компьютерной томографии (КТ) легких были выявлены признаки двухсторонней пневмонии, процент поражения составлял 68. В обоих легких, преимущественно в верхних и средних отделах, от-

носительно симметрично определялись мономорфные очаги, расположенные на фоне усиленного и деформированного легочного рисунка. Размеры очагов варьировали от 2 до 8 мм. Визуализировались внутригрудные лимфатические узлы размером до 1,6 см, неоднородной структуры. После получения подтверждения инфицирования вирусом SARS-CoV-2 (положительный результат теста на РНК вируса в мазке со слизистой носоглотки) пациент был направлен на госпитализацию в специализированное пульмонологическое отделение для лечения COVID-19 с диагнозом «Вирусная пневмония. Саркоидоз легких». При дообследовании были выявлены следующие сопутствующие заболевания: артериальная гипертензия II ст., риск 4, ишемическая болезнь сердца.

Из анамнеза: в амбулаторных условиях принимал монооксидин 0,2 мг при артериальном давлении (АД) выше 150/90 мм рт.ст.; каптоприл 25 мг по 1 табл. под язык при АД выше 140/90 мм рт.ст.; ацетилсалициловую кислоту 100 мг по 1 табл. 1 раз в день; метопролол 5,0 мг по 0,5 табл. 2 раза в день; лизиноприл 5 мг по 1 табл. 1 раз в день под контролем АД. Наблюдался по поводу саркоидоза легких и внутригрудных лимфатических узлов в течение 3 лет. Диагноз был установлен на основании характерной клинико-рентгенологической картины и подтвержден динамическим наблюдением. На этапе диагностики проводилась спирометрия с определением объемов (ФЖЕЛ, ОФВ1 и их соотношения ОФВ1/ФЖЕЛ%) и объемных скоростей — пиковой и мгновенных на уровне 25, 50 и 75% от начала форсированного выдоха (МОС₂₅, МОС₅₀ и МОС₇₅). Показатели соответствовали незначительным нарушениям функции внешнего дыхания по обструктивному типу. Было рекомендовано применение глюкокортикостероидов (ГКС) под контролем АД, массы тела, глюкозы крови.

При объективном обследовании: общее состояние — тяжелое. Кожные покровы с немногочисленными папулезными высыпаниями, сухие. Температура — 37,8°C. Неврологический статус: в сознании, контакту доступен. Движения в конечностях ограничены. Чувствительность не нарушена. Зрачки: d = s = 4 мм, фотореакция живая, плохая фиксация взгляда. Корнеальные рефлексы живые. Носогубный рисунок симметричный. Тип телосложения нормостенический, рост — 175 см, вес — 79 кг. При аускультации легких дыхание симметричное, жесткое, справа и в нижних отделах ослаблено, ЧДД — 32 в минуту, SatO₂ — 45%. Со стороны сердечно-сосудистой системы: тоны сердца приглушены, ЧСС — 90 уд/мин, пульс на лучевой артерии удовлетворительно наполнения и напряжения, артериальное давление — 150/80 мм рт.ст. Со стороны пище-

варительно системы: язык сухой, у корня обложен «грязным» налетом, живот при пальпации мягкий, симметричный, безболезненный. Мочеполовая система без особенностей.

Проведенные лабораторные исследования выявили изменения в гемограмме в виде палочкоядерного сдвига, ускоренного СОЭ, моноцитоза, лимфоцитоза, лейкоцитоза. В биохимическом анализе крови определялось повышение уровня креатинина, гипергаммаглобулинемия, повышенные активности серомукоида, сиаловых кислот. В коагулограмме — признаки гиперфибринемии, незначительное повышение D-димера. В общем анализе мочи — лейкоцитурия.

При анализе мокроты кислотоустойчивые микобактерии и рост колоний микобактерий туберкулеза обнаружены не были. Результаты ИФА сыворотки крови на антитела к микобактериям туберкулеза отрицательны. Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) по формуле СКД-ЕРІ 57 мл/мин/1,73 м², по методу MDRD 56 мл/мин/1,73 м², то есть выявлено умеренное снижение СКФ — III стадия хронической болезни почек. Клиренс креатинина по Кокрофту—Голту: 68 мл/мин (61 мл/мин/1,73 м²). Индекс массы тела: 25,5 кг/м².

При анализе результатов эхокардиографического обследования обращали на себя внимание признаки легочной гипертензии (норма систолического давления до 25 мм рт.ст.). На электрокардиограмме признаки ишемии: депрессия сегмента ST, инверсия зубца T, элевация ST.

В условиях стационара было начато лечение: ГКС, антибактериальные средства, антикоагулянты, искусственная вентиляция легких.

На третьи сутки стационарного лечения появились признаки прогрессирования респираторной недостаточности в виде уменьшения уровня SatO₂ до 43% (по пульсоксиметру) при дыхании атмосферным воздухом, появление тахипноэ до 28/мин. На контрольной КТ: признаки диффузного уплотнения легочной ткани по типу «матового стекла», субплевральные очаги фиброзного характера, значительное поражение легких — 87%. Учитывая тяжесть состояния, пациент был переведен в отделение реанимации, начато НИВЛ в режиме СРАР с РЕЕР 8 см вод.ст. и фракции вдыхаемого кислорода (FiO₂) 50% с периодическими сеансами прона-позиции по 6–10 ч, проведена коррекция кислотно-основного состояния и водно-электролитного баланса, смена антибиотикотерапии, начато целенаправленное лечение «цитокинового шторма» антагонистом IL-6 препаратом саруламаб.

Несмотря на проводимое лечение, состояние больного прогрессивно ухудшалось, нарастали явления легочной недостаточности. Реанимационные мероприятия в течение 30 мин

оказались неэффективны. Констатирована биологическая смерть. Выставлен заключительный клинический диагноз: «Коронавирусная инфекция COVID-19, тяжелая форма». Осложнения: «Двухсторонняя полисегментарная вирусная пневмония, тяжелое течение». Конкурирующее заболевание: «Саркоидоз легких и внутригрудных лимфатических узлов». Сопутствующий диагноз: «ИБС. Артериальная гипертензия II ст., риск 4». Направлен на патологоанатомическое вскрытие.

На секционное исследование доставлен труп мужчины 50 лет, среднего роста, удовлетворительного питания. На коже определяются макуло-папулезные высыпания, на отдельных участках — очаги гипо- и гиперпигментации. Подкожно-жировая клетчатка в области пупка толщиной до 4 см, на груди — 3,5 см. Глаза прикрыты веками, глазные яблоки размягчены, склеры белые, роговицы помутневшие, радужки коричневые, зрачки округлой формы, симметричные, по 0,4 см в диаметре. Грудная клетка цилиндрической формы. Живот округлый, на уровне реберных дуг. Мягкие ткани конечностей отекающие. Трупные пятна сиреневые, расположены на задней поверхности туловища и конечностей. Трупное окоченение развито удовлетворительно.

Верхние дыхательные пути проходимы, слизистые оболочки трахеи, бронхов отекающие, розовые, с мелкими точечными кровоизлияниями. В просвете трахеи и бронхов небольшое количество пенистой жидкости. В плевральных полостях по 70 мл розовой прозрачной жидкости, плевральные листки гладкие, красные. Легкие тяжелые, при пальпации разной плотности, безвоздушные. На разрезах темно-красного цвета, с поверхностей разрезов стекает красная жидкость. Над поверхностью разрезов выступают бронхо-сосудистые элементы, бронхи режутся с хрустом. В просвете сосудов темная жидкая кровь и сгустки. Лимфатические узлы корней легких увеличены в диаметре до 2,0 см, на разрезах неоднородные. При микроскопическом исследовании: определяются гиалиновые мембраны, выстилающие и повторяющие контуры стенок альвеол (рис. 1, вклейка, с. II), в просвете альвеол — слущенный эпителий с геморрагическим компонентом, немногочисленные многоядерные клетки, макрофаги, белковые массы (рис. 1, 2, вклейка, с. II), скопление отекающей жидкости. В стенках альвеол выявляются участки некрозов и десквамация альвеолярного эпителия в виде разрозненных клеток или пластов, участки кровоизлияний и гемосидерофаги. Сосуды умеренно полнокровные, окруженные периваскулярными инфильтрациями. В просвете бронхов — тотально слущенный эпителий, слизь. На слизистой оболочке

бронхов, преимущественно субэндотелиально, определяются гранулемы, без казеозного некроза. В лимфатических узлах корней легких выявляются неказеозные гранулемы, состоящие из скоплений эпителиоидных гистиоцитов и гигантских клеток Лангханса, окруженных лимфоцитами.

Определялись признаки саркоидоза легких. При гистологическом исследовании в легких симметрично располагались дискретные неказеифицированные эпителиоидно-клеточные гранулемы размерами от 2 до 8 мм, состоящие из высокодифференцированных мононуклеарных фагоцитов (эпителиоидных и гигантских клеток) и лимфоцитов (рис. 3, 4, 5, III обложка). Определялись гранулемы с пролиферативным компонентом, с участками кровоизлияний. Выявлялись гигантские клетки с цитоплазматическими включениями — астероидные тельца и тельца Шаумана. Встречались тельца Хамазаки–Везенберга, локализованные в гранулемах, в зонах периферических синусов лимфоузлов внутри гигантских клеток и представляющие собой овальные, округлые или вытянутые структуры размером 0,4–0,7 мкм, содержащие липофусцин. Также имело место наличие центросфер — определяющихся кластеров вакуолей в цитоплазме гигантских клеток. При окраске гематоксилином и эозином эти структуры напоминали грибы. Обращает внимание наличие гранулематозной инфильтрации легочных сосудов, в том числе капилляров и вен.

Сердце при макроскопическом исследовании размерами 12 × 10 × 7 см, массой 360 г. Венечные артерии магистрального типа, в просвете их жидкая кровь, стенки режутся с хрустом, на интима атерофиброзные наложения суживающие просвет артерий до 80% левой коронарной артерии, до 85% передней межжелудочковой артерии, до 89% огибающей артерии, до 85% правой коронарной артерии. В полостях сердца красные посмертные сгустки и жидкая кровь, полости не расширены, эндокард влажный, гладкий. Створки клапанов подвижные, смыкаются плотно, сухожильные нити тонкие, гладкие. Миокард дряблый, на разрезах красно-коричневый, с серо-белесоватыми периваскулярными прожилками. Толщина миокарда правого желудочка сердца — 0,4 см, левого — 1,9 см. При гистологическом исследовании выявлялась фрагментация некоторых кардиомиоцитов, мелкоочаговый склероз, очаговая гипертрофия кардиомиоцитов с умеренным межучасточным отеком, эритроцитарными сладжами (рис. 6, III обложка). Сосуды микроциркуляторного русла — малокровные, определялась гипертрофия стенок мелких артерий и артериол.

При вирусологическом исследовании секционного материала РНК SARS-CoV-2 обнаружена в легких; в головном мозге, селезенке, печени — не обнаружена.

Выставлен патологоанатомический диагноз. Основное заболевание: «Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (при вирусологическом исследовании секционного материала в легких обнаружена РНК SARS-CoV-2)». Конкурирующее заболевание: «Саркоидоз легких и внутригрудных лимфоузлов». Осложнения основного заболевания: «Двухсторонняя тотальная вирусная пневмония. Острый респираторный дистресс-синдром взрослых. Отек легких». Сопутствующие заболевания: «Гипертоническая болезнь: концентрическая гипертрофия миокарда (масса сердца 360 г, толщина стенки левого желудочка — 1,9 см, правого — 0,4 см). Хроническая ишемическая болезнь сердца: стенозирующий атеросклероз коронарных артерий, кардиосклероз».

Обсуждение

Описан случай развития осложненного течения вирусной пневмонии, вызванной вирусом SARS-CoV-2, у пациента с саркоидозом легких и сердечно-сосудистой патологией. Клинически выявляемые признаки легочной гипертензии связаны, очевидно, не только с сердечно-сосудистой патологией, но и с гранулематозной инфильтрацией легочных сосудов, в том числе капилляров и вен, выявленной при секционном исследовании. Сочетание вирусного воспаления, обусловленного COVID-19, снижения легочных объемов и диффузии на фоне существующего саркоидоза легких, повышение гидростатического давления в сосудах микроциркуляторного русла привело к развитию тяжелой дыхательной недостаточности пациента, в виде ОРДС и отеку легких [7, 8, 9]. ОРДС представляет собой сложный клинический синдром с гетерогенным клиническим фенотипом, что затрудняет его изучение. Возникающие микроциркуляторные нарушения на уровне альвеолярно-капиллярной мембраны, приводят к снижению диффузии газов крови, отеку альвеол и интерстициального пространства. Все это способствует развитию гипоксемии, которая и так наблюдалась у пациента в связи с сопутствующей патологией, снижению экскреции углекислого газа и, в конечном счете, ведет к острой дыхательной недостаточности. Кроме того, при ОРДС нарушается осмотический градиент и снижается клиренс альвеолярной жидкости, что еще больше усугубляет неспособность удалять отечную жидкость из дистальных отделов легких.

Заключение

На основании данных медицинской документации и результатов патологоанатомического исследования следует, что причиной смерти больного Р.А., 50 лет, является новая коронавирусная инфекция COVID-19, вы-

званная двухстороннюю тотальную вирусную пневмонию. Несомненно, что наличие конкурирующих заболеваний, таких как саркоидоз легких и артериальная гипертензия, усугубили течение болезни, поспособствовав развитию раннего ОРДС и привели к летальному исходу [3, 4].

Список литературы/References

1. Визель А.А. Саркоидоз: монография. М.: Издательский холдинг «Атмосфера», 2010. 416 с. [Vizel A.A. Sarcoidosis: monography. Moscow: Atmosfera, 2010. 416 p. (In Russ.)]
2. Визель А.А., Визель И.Ю., Шакирова Г.Р. Саркоидоз в период пандемии новой инфекции COVID-19 // Медицинский алфавит. 2020. Т. 1, № 19. С. 65–69. [Vizel A.A., Vizel I.Yu., Shakirova G.R. Sarcoidosis during COVID-19 new pandemic infection. *Meditsinskii alfavit = Medical Alphabet*, 2020, vol. 1, no. 19, pp. 65–69. (In Russ.)] doi: 10.33667/2078-5631-2020-19-65-69
3. Воробьева О.В., Ласточкин А.В. Изменения в головном мозге, легких и сердце при COVID-19 на фоне цереброваскулярной патологии // Профилактическая медицина. 2020. Т. 23, № 7. С. 43–46. [Vorobeva O.V., Lastochkin A.V. Changes in the brain, lungs and heart with COVID-19 against the background of cerebrovascular pathology. *Profilakticheskaya meditsina = The Russian Journal of Preventive Medicine*, 2020, vol. 23, no. 7, pp. 43–46. (In Russ.)]
4. Воробьева О.В., Ласточкин А.В. Острый инфаркт миокарда и коронавирусная инфекция (COVID-19) // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2021. Т. 10, № 1 (36). С. 93–97. [Vorobeva O.V., Lastochkin A.V. Acute myocardial infarction and coronavirus infection (COVID-19). *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Education*, 2021, vol. 10, no. 1 (36), pp. 93–97. (In Russ.)] doi: 10.33029/2305-3496-2021-10-1-93-97
5. Kobak S. Catch the rainbow: prognostic factor of sarcoidosis. *Lung India*, 2020, vol. 37, no. 5, pp. 425–432. doi: 10.4103/lungindia.lungindia_380_19
6. Loke W.S., Herbert C., Thomas P.S. Sarcoidosis: immunopathogenesis and immunological markers. *Int. J. Chronic. Dis.*, 2013, vol. 2013: 928601. doi: 10.1155/2013/928601
7. Patel N., Kalra R., Doshi R., Arora H., Bajaj N.S., Arora G., Arora P. Hospitalization rates, prevalence of cardiovascular manifestations, and outcomes associated with sarcoidosis in the United States. *J. Am. Heart Assoc.*, 2018, vol. 7, iss. 2: e007844. doi: 10.1161/JAHA.117.007844
8. Southern B.D. Patients with interstitial lung disease and pulmonary sarcoidosis are at high risk for severe illness related to COVID-19. *Cleve Clin. J. Med.*, 2020. doi: 10.3949/ccjm.87a.ccc026
9. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10229, pp. 1054–1062. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3

Авторы:

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

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

Романова Л.П., к.б.н., доцент кафедры дерматовенерологии с курсом гигиены ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия.

Authors:

Vorobeva O.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation;

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

Romanova L.P., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Dermatovenereology and Hygiene, Cheboksary, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.01.2022
Отправлена на доработку 21.02.2022
Принята к печати 25.04.2022

Received 25.01.2022
Revision received 21.02.2022
Accepted 25.04.2022

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. Традиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, кДа и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их включения в текст статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка в отдельный файл. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
 - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
 - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
 - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
 - полное название статьи, направляемой в редакцию;
 - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
 - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
 - дата отправления работы.
 - 2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»).

- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
 - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
- 6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
- 7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
- 8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий, редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы 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

Аак О.В.	1069	Леденева М.Л.	1091	Anh L.T.	1143
Абовян Р.А.	1149	Леонов Д.А.	1029	Belenjuk V.D.	1040
Аветисян Ш.М.	1149	Локтев В.Б.	1103	Blinova O.V.	1019
Барышников Н.В.	1129	Малишевская О.И.	1129	Borisov A.G.	1040
Беляков Н.А.	1029	Мелик-Андреасян Г.Г.	1149	Chomsky I.N.	1136
Боева Е.В.	1029	Монахова Е.В.	1156	Cuong Q.H.	1081
Брюхачева Е.О.	1169	Мудров В.П.	1186	Diep T.N.N.	1081
Бывалов А.А.	1163	Никитина Т.Н.	1113	Egorova S.A.	1081
Ванян А.В.	1149	Николенко М.В.	1129	Emerole K.C.	1123
Васева Е.М.	1129	Новикова О.Д.	1163	Huong T.D.	1081
Васильева Н.В.	1069	Носков А.К.	1156	Kaftyreva L.A.	1081
Власова М.А.	1175	Отлушкина Л.Ю.	1169	Kaigorodov D.G.	1061
Водолянов А.С.	1156	Палозян Г.О.	1149	Kaigorodova A.D.	1061
Воробьева О.В.	1191	Портнягина О.Ю.	1163	Klimkova P.V.	1123
Вторушина В.В.	1051	Пьянзова Т.В.	1169	Kozhevnikov G.M.	1123
Гималдинова Н.Е.	1191	Романова Л.П.	1191	Kozhukhova E.A.	1081
Даниленко Д.М.	1029	Сабурова М.С.	1181	Kudryavcev I.V.	1040
Долгушина Н.В.	1051	Сварваль А.В.	1009	Kumbayono K.	1136
Драпкина Ю.С.	1051	Свирин К.А.	1103	Lan T.Q.T.	1081
Евсеева Г.П.	1175	Селянская Н.А.	1156	Loi C.B.	1143
Ежова М.И.	1156	Симакина О.Е.	1029	Long T.N.	1081
Еноктаева О.В.	1129	Соболев А.В.	1069	Makarova M.A.	1081
Захарова И.Б.	1091	Соловьева И.Л.	1113	Samotolkina E.S.	1123
Захарова Ю.В.	1169	Старкова Д.А.	1009	Savchenko A.A.	1040
Инвиева Е.В.	1051	Супрун Е.Н.	1175	Sinh C.T.	1143
Карташов М.Ю.	1103	Супрун С.В.	1175	Thang T.D.	1143
Климко Н.Н.	1069	Тараскина А.Е.	1069	Thang T.T.	1143
Козлова Я.И.	1069	Терновой В.А.	1103	Thu L.K.N.	1081
Кондратенко О.В.	1181	Ткаченко Г.А.	1091	Tokarevich N.K.	1019
Коньшев И.В.	1163	Тупота Н.Л.	1103	Tram K.V.	1081
Костинов М.П.	1113	Учеваткина А.Е.	1069	Truong Q.N.	1081
Кречетова Л.В.	1051	Филиппова Л.В.	1069	Tu L.K.B.	1081
Кривошеина Е.И.	1103	Фролова Е.В.	1069	Vijayadas D.	1136
Кругликов В.Д.	1156	Хайдуков С.В.	1051	Voznesenskiy S.L.	1123
Кудерова Н.И.	1175	Хасанова А.А.	1113	Vu H.N.	1081
Кудрявцев И.В.	1069	Холодов А.А.	1169	Wihastuti T.A.	1136
Лебедько О.А.	1175	Хромова Е.А.	1113		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аллергический бронхолегочный аспергиллез	1069	острые кишечные инфекции	1156	efficacy	1143
антибиотикочувствительность	1156	острые респираторные вирусные инфекции	1029	embryonic stem cells	1061
антигены	1163	инфекционный контроль	1149	enzyme	1136
антитела	1051, 1163	оценка	1149	<i>Helicobacter pylori</i>	1009
биоинформационный анализ	1156	пневмония	1191	HIV infection	1123
биопленка	1129	полногеномное секвенирование	1156	hpAfrica1	1009
бронхиальная астма	1069, 1175	полость рта	1181	hpAfrica2	1009
вакцинация	1051	порины	1163	hpAsia2	1009
вирус гриппа	1029	постковидный период	1113	hpEastAsia	1009
вирус клещевого энцефалита	1103	профилактика инфекций	1149	hpEurope	1009
ВИЧ-инфекция	1169	ПЦР-диагностика	1103	hpNEAfrica	1009
вопросник	1149	ритмометрические параметры	1129	hpSahul	1009
ВЧГ-6	1175	саркоидоз легких	1191	inflammatory cells	1136
ВЭБ	1175	сенсibilизация	1163	intensive care unit	1123
Гам-КОВИД-Вак	1051	синдром	1029	IPCAF	1149
генотипирование	1091, 1103	синегнойная инфекция	1181	<i>Leptospira</i>	1019
гетерогенность	1181	слюна	1113	<i>Leptospira</i> serovars	1019
гипертензия	1191	стационар	1149	leptospirosis	1019
гранулемы	1191	структура популяции	1009	long course	1143
грибы рода <i>Candida</i>	1129, 1169	тандемные повторы	1091	Lp-PLA2	1136
дети	1175	туберкулез	1169	medications	1123
иксодовые клещи	1103	факторы патогенности	1156	MLVA	1091
иммунные клетки	1186	филогеография	1091	monocytes population	1136
иммунный ответ	1051, 1069	хемокины	1069	morbidity	1019
иммунный статус	1175	холерные вибрионы неO1/неO139 (НАГ-вибрионы)	1156	multidrug resistance	1081
иммунодиагностика	1186	хронический пародонтит	1186	neurocysticercosis	1143
интерференция	1029	эпидемиология	1029	NKT cells	1040
интерферон альфа-2b	1113	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1069	peritonitis	1040
кандидозный дисбиоз	1129	acquired immunodeficiency syndrome	1123	phenotype	1040
коинфекция ТБ/ВИЧ	1169	albendazole	1143	polypharmacy	1123
контролируемое течение	1175	antibacterial activity	1061	postoperative period	1040
лазерная ловушка	1163	antibodies	1019	pro-atherogenic marker	1136
лекарственная резистентность	1169	antimicrobial properties	1061	random forest	1186
макротрический метод	1129	antimicrobial resistance	1081	rats	1019
масс-спектрометрия	1181	atherosclerosis	1136	<i>Rickettsia</i> spp.	1103
машинное обучение	1186	bactericidal effect	1061	safety	1143
микозы	1169	<i>Borrelia</i> spp.	1103	<i>Salmonella</i>	1081
микробиоценоз кишечника	1169	buffalo	1019	SARS-CoV-2	1029, 1051
мокрота	1181	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1091	secretome	1061
мРНК цитокинов	1186	CD3-CD56 ⁺	1040	seroprevalence	1019
муковисцидоз	1181	COVID-19	1029, 1051, 1113, 1149	serovar	1081
мукозальный иммунитет	1113	disease outcome	1040	sIgA	1113
назальные смывы	1113	drug-drug interactions	1123	SNPs	1091
острый респираторный дистресс-синдром	1191			T-хелперы клетки памяти	1069
				<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1163

Иллюстрация к статье «Филогенетическая структура глобальной популяции *Helicobacter pylori*» (авторы: Д.А. Старкова, А.В. Сварваль) (с. 1009–1018)

Illustration for the article “Phylogenetic structure of the global population of *Helicobacter pylori*” (authors: Starkova D.A., Svarval A.V.) (pp. 1009–1018)

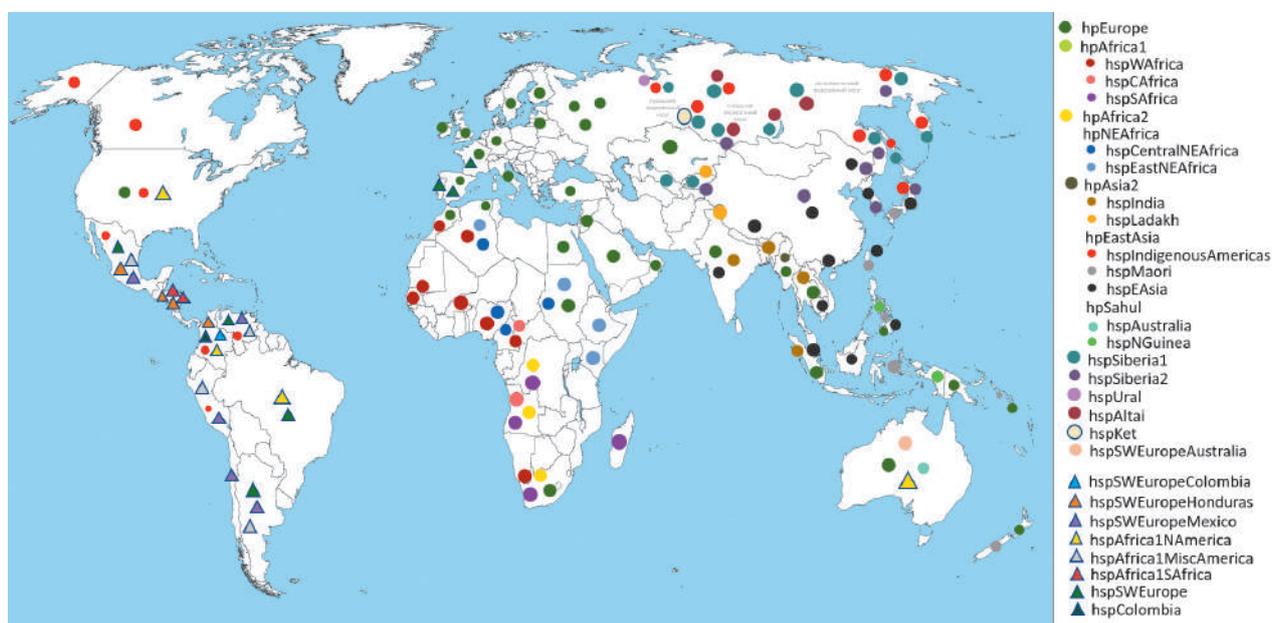


Рисунок 2. Географическое распределение популяций и субпопуляций штаммов *H. pylori*

Figure 2. Geographic distribution of *H. pylori* strain populations and subpopulations

Примечание. Популяции и субпопуляции штаммов *H. pylori* промаркированы соответствующими цветами; положение кружков и треугольников на карте указывает территорию выявления штаммов *H. pylori* соответствующих популяций/ субпопуляций.

Note. Populations and subpopulations of *H. pylori* strains are color-coded; the position of circles and triangles on the map indicates the area of detected *H. pylori* strains of the corresponding populations/subpopulations.

Иллюстрации к статье «Полость рта как локус для формирования гетерогенной бактериальной популяции у пациентов с муковисцидозом» (авторы: О.В. Кондратенко, М.С. Сабурова) (с. 1181–1185)
 Illustrations for the article “The oral cavity as a site for developing a heterogeneous bacterial population in patients with cystic fibrosis” (authors: Kondratenko O.V., Saburova M.S.) (pp. 1181–1185)

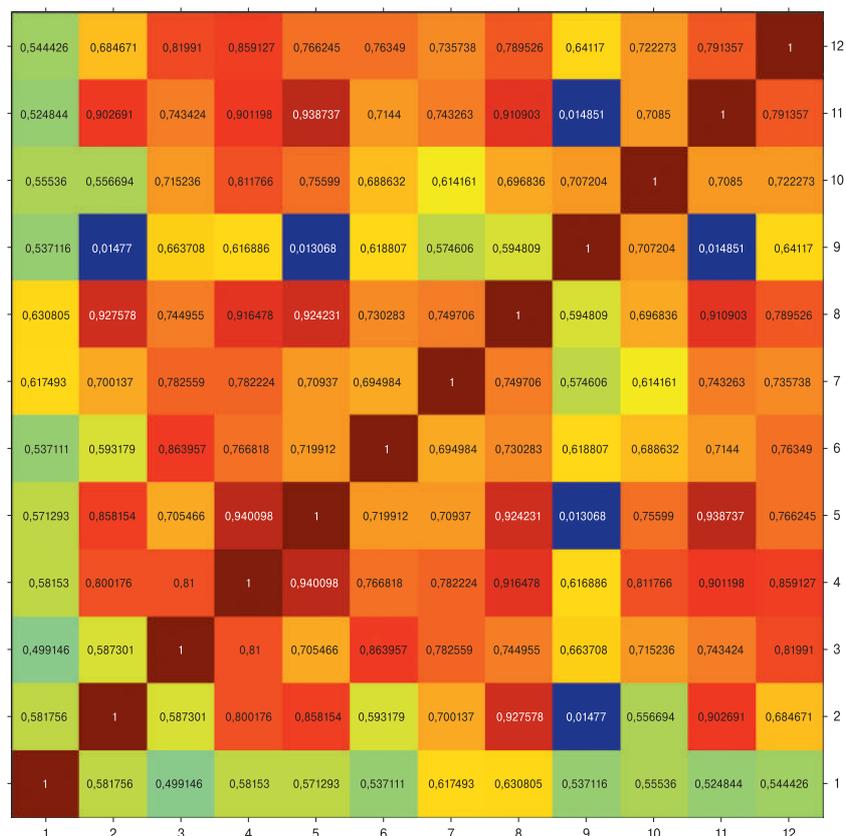


Рисунок. CCI-матрица, построенная с использованием штаммов, выделенных из мокроты и полости рта пациента, и контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853

Figure. CCI-matrix constructed by using strains isolated from the sputum and oral cavity of the patient as well as a control strain of *P. aeruginosa* ATCC 27853

Иллюстрации к статье «Патоморфологические признаки ОРДС при конкурирующих заболеваниях легких: COVID-19 и саркоидоз» (авторы: О.В. Воробьева, Н.Е. Гималдинова, Л.П. Романова) (с. 1191–1196)
 Illustrations for the article “Pathomorphological features of ARDS in competing lung diseases: COVID-19 and sarcoidosis” (authors: Vorobeva O.V., Gimaldinova N.E., Romanova L.P.) (pp. 1191–1196)

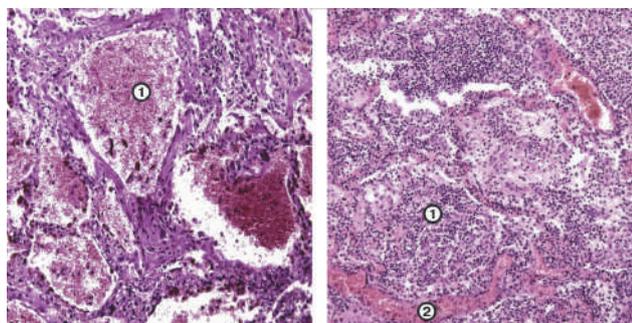


Рисунок 1. Микроскопическая картина пневмонии: в просвете альвеол слущенный эпителий, макрофаги, эритроциты (1), полнокровие межалвеолярных перегородок (2). Окраска гематоксилином и эозином, ×400

Figure 1. Microscopic picture of pneumonia: desquamated epithelium, macrophages, erythrocytes (1), plethora of interalveolar septa (2) in the lumen of the alveoli. Hematoxylin and eosin staining, ×400

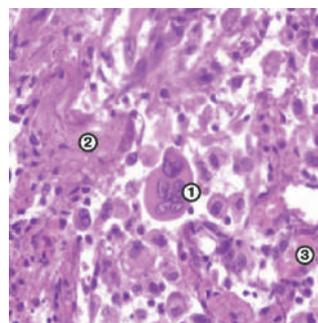


Рисунок 2. Микроскопическая картина изменений в легких: в просвете альвеол многоядерные клетки (1), полнокровие сосудов (2), белковые массы (3). Окраска гематоксилином и эозином, ×900

Figure 2. Microscopic picture of changes in the lungs: multinucleated cells (1), vascular congestion (2), protein masses (3) in the lumen of the alveoli. Staining with hematoxylin and eosin, ×900

Иллюстрации к статье «Патоморфологические признаки ОРДС при конкурирующих заболеваниях легких: COVID-19 и саркоидоз» (авторы: О.В. Воробьева, Н.Е. Гималдинова, Л.П. Романова) (с. 1191–1196)
Illustrations for the article "Pathomorphological features of ARDS in competing lung diseases: COVID-19 and sarcoidosis" (authors: Vorobeva O.V., Gimaldinova N.E., Romanova L.P.) (pp. 1191–1196)

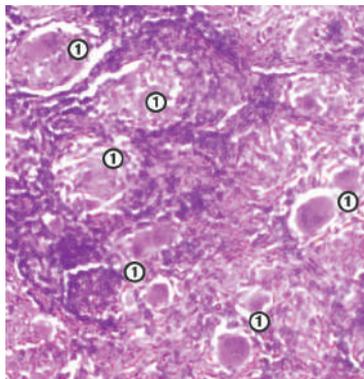


Рисунок 3. Микроскопическая картина саркоидоза легких: эпителиоидно-клеточные гранулемы. Окраска гематоксилином и эозином, ×400

Figure 3. Microscopic picture of pulmonary sarcoidosis: epithelioid cell granulomas. Staining with hematoxylin and eosin, ×400

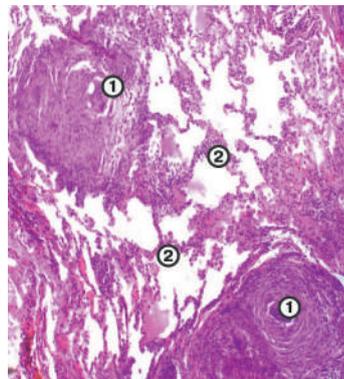


Рисунок 4. Микроскопическая картина эпителиоидно-клеточных гранулем (1), расположенных вокруг расширенных альвеол (2). Окраска гематоксилином и эозином, ×400

Figure 4. Microscopic picture of epithelioid cell granulomas (1) located around dilated alveoli (2). Staining with hematoxylin and eosin, ×400

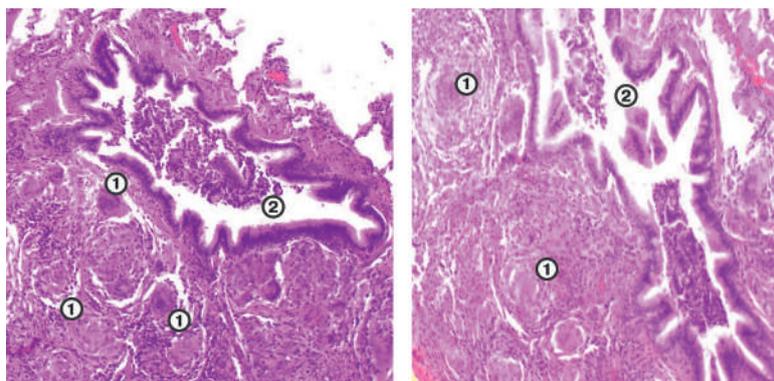


Рисунок 5. Микроскопическая картина эпителиоидно-клеточных гранулем (1), расположенных вокруг расширенного бронха (2). Окраска гематоксилином и эозином, ×400

Figure 5. Microscopic picture of epithelioid cell granulomas (1) located around dilated bronchus (2). Staining with hematoxylin and eosin, ×400

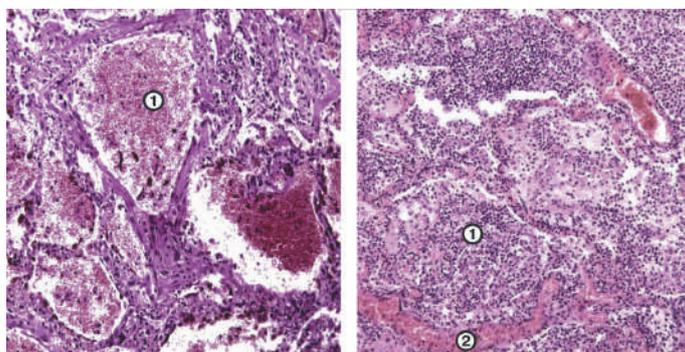


Рисунок 6. Микроскопическая картина кардиосклероза (1) с эритроцитарными сладжами (2), гипертрофированные кардиомиоциты (3). Окраска гематоксилином и эозином, ×900

Figure 6. Microscopic picture of cardiomyocytes (1) with erythrocyte sludge (2), hypertrophic cardiomyocytes (3). Staining with hematoxylin and eosin, ×900

Подписной индекс:
Урал-Пресс – 41392

