

2023



ИНФЕКЦИЯ
И
ИММУНИТЕТ

Иллюстрации к статье «Влияние длительной антибиотикотерапии на состав и метаболический профиль кишечного микробиома при туберкулезе легких» (авторы: М.М. Юнусбаева, Д.Р. Терентьева, Л.Я. Бородина, А.М. Закирова, Ш.Э. Булатов, Ф.С. Билалов, Б.Б. Юнусбаев) (с. 1079–1090)

Illustrations for the article “Influence of long-term antibiotic therapy on gut microbiome composition and metabolic profile in pulmonary tuberculosis” (authors: Yunusbaeva M.M., Terentyeva D.R., Borodina L.Ya., Zakirova A.M., Bulatov S.E., Bilalov F.S., Yunusbayev B.B.) (pp. 1079–1090)

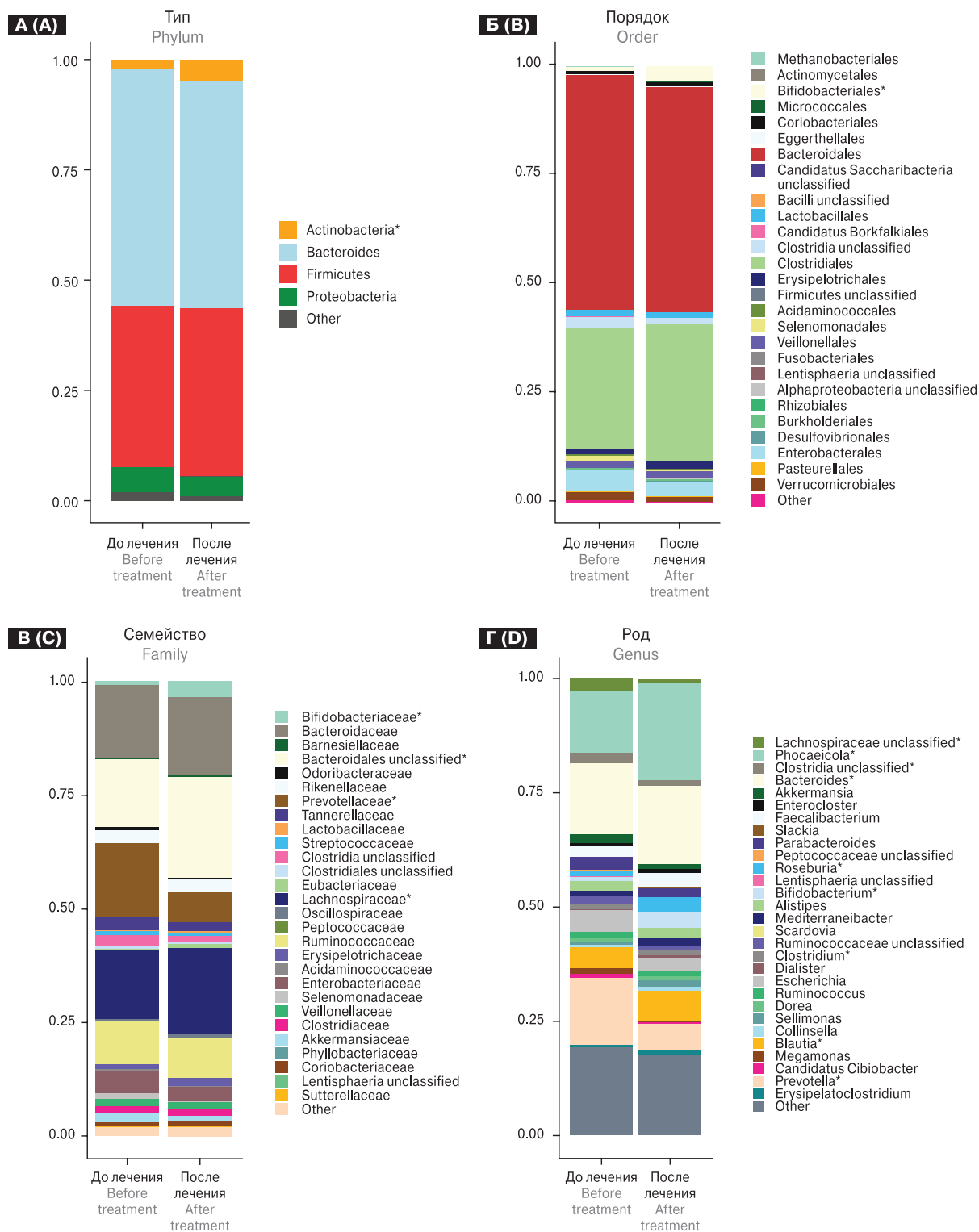


Рисунок 2. Таксономический состав микробиоты кишечника в исследуемых группах больных ТБ на уровне типа, порядка, семейства и рода

Figure 2. Taxonomic composition of the intestinal microbiota in the TB groups at the level of phylum, order, family, and genus

Примечание. * — указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Note. * — significant at the 0.05 level ($p < 0.05$).

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

ноябрь–декабрь

2023, том 13

№ 6

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

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

- Апт А.С.** д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики Центрального НИИ туберкулеза, Москва, Россия
Барбеито Л. д.м.н., профессор, зав. лабораторией нейродегенерации Института Пастера, Монтевидео, Уругвай
Брей П. д.б.н., профессор, зав. лабораторией медицинской энтомологии и биологии переносчиков болезней Института Пастера в Лаосе, Вьентьян, Лаос
Гинцбург А.Л. д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
Лаврентьева И.Н. д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Лобзин Ю.В. д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
Лоузир Э. профессор, президент Института Пастера Туниса, Тунис
Львов Д.К. д.м.н., профессор, академик РАН, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
Маеда К. д.вет.н., профессор, директор Национального института инфекционных заболеваний, Токио, Япония
Медуницын Н.В. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия
Михайлов М.И. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Российского университета дружбы народов, Москва, Россия
Найденски Х. д.м.н., профессор, зав. отделом инфекционной микробиологии Института микробиологии им. Стефана Ангеловфа, София, Болгария
Онищенко Г.Г. д.м.н., профессор, академик РАН, зам. председателя Российской академии образования, Москва, Россия
Покровский В.В. д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель Федерального НМЦ по профилактике и борьбе со СПИДом, Москва, Россия
Сантони А. зам. директора по научной работе Института Пастера в Риме, профессор иммунологии и иммунопатологии отдела молекулярной медицины Университета Сапиенца в Риме, Рим, Италия
Симбирцев А.С. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
Тотоян Артем А. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
Фрейдлин И.С. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
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 Камбоджи, Пномпень, Камбоджа

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 22.12.2023 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1004

© Инфекция и иммунитет
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2023
© НИИЭМ имени Пастера, 2023
© СПб РО РААКИ, 2023

Russian Journal of Infection and Immunity (Infektsiya i immunitet)

November–December

2023, volume 13

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 DSc (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 DSc (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** DSc (Biology), Professor, Central Research Institute of Tuberculosis, Head of the Laboratory of Immunogenetics, Moscow, Russian Federation
- Luis Barbeito** MD, PhD, Professor, Institut Pasteur de Montevideo, Head of the Laboratory of Neurodegeneration, Montevideo, Uruguay
- Paul Brey** PhD, Professor, Institut Pasteur du Laos, Director; Laboratory of Medical Entomology and Biology of Disease Vectors, Head, Vientiane, Laos
- Alexander L. Gintsburg** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Director, Moscow, Russian Federation
- Irina N. Lavrentieva** DSc (Medicine), St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg, Russian Federation
- Yuri V. Lobzin** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation
- Hechmi Louzir** Professor, Institut Pasteur de Tunis, President, Tunis, Tunisia
- Dmitry K. Lvov** DSc (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, DVM, Professor, National Institute of Infectious Diseases, Director, Tokyo, Japan
- Nikolai V. Medunitsyn** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Scientific Center for Expertise of Medical Products, Moscow, Russian Federation
- Michael I. Michailov** DSc (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, Professor, Institute Stephan Angeloff; Head of the Department of Infectious Microbiology, Sofia, Bulgaria
- Gennadiy G. Onishchenko** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Deputy President of the Russian Academy of Education, Moscow, Russian Federation
- Vadim V. Pokrovskiy** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Head of the Federal AIDS Center, Moscow, Russian Federation
- Angela Santoni** PhD, Professor, Institut Pasteur in Italy — Cenci Bolognetti Foundation, Scientific Director; Full Professor of Immunology and Immunopathology, Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, Rome, Italy
- Andrei S. Simbirtsev** DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation
- Artem A. Totolian** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Experimental Medicine, Department of Molecular Microbiology, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
- Irina S. Freidlin** DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Institute of Experimental Medicine, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
- Valery A. Chereshevnev** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology and Physiology, Scientific Director, Yekaterinburg, Russian Federation
- Andre Spiegel** MD, PhD, Professor, Institut Pasteur du Cambodge, Director, Phnom Penh, Cambodia

Members of editorial council

Vladimir A. Aleshkin	DSc (Biology), Professor, G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Director, Moscow, Russian Federation
Oleg V. Bukharin	DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Scientific Director, Orenburg, Russian Federation
Boris I. Vishnevsky	DSc (Medicine), Professor, Research Institute of Phthisiopulmonology, Head Researcher, Department of Laboratory Diagnostic, St. Petersburg, Russian Federation
Ilija I. Dolgushin	DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Chelyabinsk State Medical Academy, President, Moscow, Russian Federation
Vitaly V. Zverev	DSc (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	DSc (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Intestinal Infections, St. Petersburg, Russian Federation
Kirill P. Kashkin	DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Professor of the Department of Immunology, Moscow, Russian Federation
Olga I. Kubar	DSc (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
Victor V. Maleev	DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Adviser of the Director, Moscow, Russian Federation
Olga V. Narvskaya	DSc (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg, Leading Researcher, Russian Federation
Alevtina M. Savicheva	DSc (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	DSc (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	DSc (Medicine), Professor, Pavlov State Medical University, Head of the Department of Microbiology and Virology, St. Petersburg, Russian Federation
Susanna M. Kharit	DSc (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	DSc (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	DSc (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 22.12.2023. 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, 2023

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2023

© SPb RAACI, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Яцышина С.Б., Мамошина М.В., Елькина М.А., Поляева О.А., Михайлова Ю.В., Шеленков А.А.,
Егорова А.Е., Малеев В.В.

ИНВАЗИВНАЯ СТРЕПТОКОККОВАЯ ИНФЕКЦИЯ ГРУППЫ А С МОЛНИЕНОСНЫМ ТЕЧЕНИЕМ У ДЕТЕЙ 1009

Оригинальные статьи

Ларионова Н.В., Киселева И.В., Баженова Е.А., Степанова Е.А., Руденко Л.Г.

**ОПТИМИЗАЦИЯ СВОЙСТВ РЕАССОРТАНТНЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ,
ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ОБРАТНОЙ ГЕНЕТИКИ** 1018

Кригер Е.А., Самодова О.В., Свитич О.А., Самойликов Р.В., Меремьянина Е.А., Иванова Л.В., Бебякова Н.А.,
Ильина Е.Н., Павленко А.В., Есин Ю.И., Архипова А.Л., Ковальчук С.Н., Кудрявцев А.В.

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ИНТЕРФЕРОНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ТЯЖЕСТЬ
COVID-19 И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ** 1027

Баимова Р.Р., Останкова Ю.В., Блинова О.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ
LEPTOSPIRA spp. САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО ИНСТИТУТА ПАСТЕРА НА ОСНОВЕ
ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНА 16S рРНК** 1040

Катаева Л.В., Карпущина Н.Ф., Вакарина А.А., Колотова О.Н., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б.

**ВЛИЯНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ESCHERICHIA COLI НА ИХ АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ
АКТИВНОСТЬ ПРИ ОПИСТОРХОЗНОЙ ИНВАЗИИ** 1049

Ильинских Е.Н., Воронкова О.В., Хасанова Р.Р., Самойлов К.В., Семенова А.В., Есимова И.Е., Мотлохова Е.А.,
Ямпольская О.В., Ямпольская А.В.

**ОСОБЕННОСТИ БАЗАЛЬНОЙ И ЛИПОПОЛИСАХАРИД-ИНДУЦИРОВАННОЙ СЕКРЕЦИИ ЦИТОКИНОВ
В КУЛЬТУРАХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ЭРИТЕМНОЙ ФОРМОЙ ОСТРОГО
ИКСОДОВОГО КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИНИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ** 1058

Колотова О.Н., Катаева Л.В., Вакарина А.А., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б.

**МИКРОБНЫЕ АССОЦИАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПНЕВМОНИЙ И УРОВЕНЬ ИХ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ** 1069

Юнусбаева М.М., Терентьева Д.Р., Бородин Л.Я., Закирова А.М., Булатов Ш.Э., Билалов Ф.С., Юнусбаев Б.Б.

**ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ НА СОСТАВ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ
КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ** 1079

Попова А.Ю., Смирнов И.С., Касымов О.Т., Егорова С.А., Нурматов З.С., Дрозд И.В., Миличкина А.М.,
Смоленский В.Ю., Нуридинова З.Н., Иванов В.А., Саттарова Г.З., Рэмзи Э.С., Джангазиев В.И., Зуева Е.И.,
Араби У.У., Дробышевская В.Г., Жимбаева О.В., Разумовская А.П., Петрова О.А., Тотолян А.А.

МОНИТОРИНГ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В КИРГИЗСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ 1089

Макарова М.А., Балдэ Р., Буаро М., Матвеева З.Н., Кафтырева Л.А.

**ХАРАКТЕРИСТИКА ESCHERICHIA COLI, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ДИАРЕЙНЫМ СИНДРОМОМ
В ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ** 1109

Садеева З.З., Новикова И.Е., Лазарева А.В., Алябьева Н.М., Карасева О.В., Янющкина О.Г.,
Вершинина М.Г., Фисенко А.П.

**БАКТЕРИЕМИИ И ИНФЕКЦИИ ЦНС У ДЕТЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С KLEBSIELLA PNEUMONIAE:
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ** 1117

Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Ширшова Н.Ю., Кусевицкая М.Б., Горская О.А., Басина В.В., Машков И.А.,
Зуева Е.Б., Щемелев А.Н., Рейнгардт Д.Э., Давыденко В.С., Муккель Д.А., Тотолян А.А.

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ СКРЫТОЙ ФОРМЫ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА В У ДОНОРОВ КРОВИ
В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ** 1129

Новикова А.Ф., Попова Л.Л., Константинов Д.Ю.

РОЛЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В 1141

Дабанович В.

ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ Гам-КОВИД-Вак В ЧЕРНОГОРИИ 1150

Вализаде М., Тарджоман Т., Фархуди Б., Чоудари А., Месгарян М., СейедАлинаги С., Зангене М., Ханифезаде З.,
Аташи Х.А., Массуми-Наини Х., Аболгасеми Ш., Дезфулинежад М., Хагани Ш.

**ВЛИЯНИЕ ДОКОНТАКТНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ГИДРОКСИХЛОРОХИНОМ НА РАЗВИТИЕ ТЯЖЕЛОГО
COVID-19: РАНДОМИЗИРОВАННОЕ КОНТРОЛИРУЕМОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 1161**

СейедАлинаги С., Афсахи А.М., Афзальян А., Шахиди Р., Тамехри-заде С.С., Варшочи С., Дашти М., Гасемзаде А.,
Пашаи А., Паранджху П., Пармун Э., Парихани С.Н., Шамсабади А., Ахмади С., Пезешги П., Арджманд Г.,
Джавахериан М., Эбрахими Х., Карими А., Мехраин И., Джаханфар Ш.

**ОСПА ОБЕЗЬЯН: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЭПИДЕМИОЛОГИИ, ПАТОГЕНЕЗА,
ПРОЯВЛЕНИЙ И ИСХОДОВ 1169**

Краткие сообщения

Николенко М.В., Васева Е.М., Барышников Н.В., Малишевская О.И.

**ИЗУЧЕНИЕ КАТАЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОСИМБИОНТОВ ЖЕНСКОГО РЕПРОДУКТИВНОГО ТРАКТА
ХРОНОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ 1187**

Жестков А.В., Золотов М.О., Каданцева Е.В., Никитина Т.Р., Протасов А.Д.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВАКЦИНАЦИИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ 1192

Правила для авторов 1197

Авторский указатель 1200

Предметный указатель 1200

CONTENTS

Reviews

Yatsyshina S.B., Mamoshina M.V., Elkina M.A., Polyayeva O.A., Mikhailova Yu.V., Shelenkov A.A., Egorova A.E., Maleev V.V.

FULMINANT INVASIVE GROUP A STREPTOCOCCAL INFECTION IN CHILDREN 1009

Original articles

Larionova N.V., Kiseleva I.V., Bazhenova E.A., Stepanova E.A., Rudenko L.G.

**OPTIMIZED PROPERTIES OF LIVE VACCINE INFLUENZA REASSORTANT STRAINS
OBTAINED BY REVERSE GENETICS 1018**

*Krieger E.A., Samodova O.V., Svitich O.A., Samoilkov R.V., Meremianina E.A., Ivanova L.V., Bebyakova N.A.,
Irina E.N., Pavlenko A.V., Esin Yu.I., Arkhipova A.L., Kovalchuk S.N., Kudryavtsev A.V.*

**THE IMPACT OF POLYMORPHIC VARIANTS OF INTERFERON RECEPTOR GENES ON COVID-19 SEVERITY
AND ANTIBIOTIC RESISTANCE 1027**

Baimova R.R., Ostankova Yu.V., Blinova O.V., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K.

**MOLECULAR AND GENETIC CHARACTERIZATION OF *LEPTOSPIRA* spp. COLLECTION STRAINS FROM
THE ST. PETERSBURG PASTEUR INSTITUTE BASED ON 16S rRNA GENE SEQUENCING DATA 1040**

Kataeva L.V., Karpukhina N.F., Vakarina A.A., Kolotova O.N., Stepanova T.F., Stepanova K.B.

***ESCHERICHIA COLI* PHENOTYPIC CHARACTERISTICS AND ANTAGONISTIC ACTIVITY
IN OPISTHORCHIASIS INVASION 1049**

*Ilyinskikh E.N., Voronkova O.V., Hasanova R.R., Samoylov K.V., Semenova A.V., Esimova I.E., Motlokhova E.A.,
Yampolskaya O.V., Yampolskaya A.V.*

**FEATURES OF BASELINE AND LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED CYTOKINE SECRETION IN MONONUCLEAR
LEUKOCYTE CULTURES FROM PATIENTS WITH THE ERYTHEMA MIGRANS FORM OF ACUTE LYME
BORRELIOSIS BASED ON CLINICAL PARAMETERS 1058**

Kolotova O.N., Kataeva L.V., Vakarina A.A., Stepanova T.F., Stepanova K.B.

**MICROBIAL ASSOCIATIONS FOR PNEUMONIA CAUSATIVE AGENTS AND LEVEL OF THEIR RESISTANCE
TO ANTIMICROBIAL DRUGS DURING A NEW CORONAVIRUS INFECTION PANDEMIC 1069**

Yunusbaeva M.M., Terentyeva D.R., Borodina L.Ya., Zakirova A.M., Bulatov S.E., Bilalov F.S., Yunusbayev B.B.

**INFLUENCE OF LONG-TERM ANTIBIOTIC THERAPY ON GUT MICROBIOME COMPOSITION
AND METABOLIC PROFILE IN PULMONARY TUBERCULOSIS 1079**

*Popova A.Yu., Smirnov V.S., Kasymov O.T., Egorova S.A., Nurmatov Z.S., Drozd I.V., Milichkina A.M., Smolenski V.Yu.,
Nuridinova Z.N., Ivanov V.A., Sattarova G.Z., Ramsay E.S., Dzhangaziev B.I., Zueva E.V., Arabiy U.U., Drobyshevskaya V.G.,
Zhimbaeva O.B., Razumovskaya A.P., Totolian A.A.*

MONITORING OF CORONAVIRUS INFECTION IN THE KYRGYZ POPULATION 1089

Makarova M.A., Balde R., Boiro M., Matveeva Z.N., Kaftyreva L.A.

**FEATURES OF *ESCHERICHIA COLI* SAMPLES FROM PATIENTS WITH DIARRHEAL SYNDROME
IN THE REPUBLIC OF GUINEA 1109**

Sadeeva Z.Z., Novikova I.E., Lazareva A.V., Alyabyeva N.M., Karaseva O.V., Yanushkina O.G., Vershinina M.G., Fisenko A.P.

**PEDIATRIC BACTEREMIA AND CNS INFECTIONS ASSOCIATED WITH *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*:
MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS AND CLINICAL FEATURES 1117**

*Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Shirshova N.Yu., Kusevitskaya M.B., Gorskaya O.A., Basina V.V., Mashkov I.A., Zueva E.B.,
Shchemelev A.N., Reingardt D.E., Davydenko V.S., Mukkel D.A., Totolian A.A.*

PREVALENCE OF OCCULT HEPATITIS B INFECTION AMONG BLOOD DONORS IN SAINT PETERSBURG 1129

Novikova A.F., Popova L.L., Konstantinov D.Yu.

THE ROLE OF RECOMBINANT INTERLEUKIN-2 IN TREATMENT OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B 1141

Dabanovic V.

SIDE EFFECTS FOLLOWING ADMINISTRATION OF THE GAM-COVID-VAC IN MONTENEGRO 1150

Valizadeh M., Tarjoman T., Farhoudi B., Chouhdari A., Mesgarian M., SeyedAlinaghi S., Zangeneh M., Hanifezadeh Z., Atashi H.A., Massumi-Naini H., Abolghasemi S., Dezfulinejad M., Haghani S.

EFFECT THE PRE-EXPOSURE PROPHYLACTIC OF HYDROXYCHLOROQUINE ON SEVERE COVID-19 DISEASE: A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL 1161

SeyedAlinaghi S., Afsahi A.M., Afzalian A., Shahidi R., Tamheri Zadeh S.S., Varshochi S., Dashti M., Ghasemzadeh A., Pashaei A., Paranjkhoo P., Parmoon Z., Parikhani S.N., Shamsabadi A., Ahmadi S., Pezeshgi P., Arjmand G., Javaherian M., Ebrahimi H., Karimi A., Mehraeen E., Jahanfar S.

MONKEYPOX: A SYSTEMATIC REVIEW OF EPIDEMIOLOGY, PATHOGENESIS, MANIFESTATIONS, AND OUTCOMES 1169

Short communications

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

CHRONOBIOLOGICAL APPROACH TO STUDY MICROSymbiont CATALASE ACTIVITY IN FEMALE REPRODUCTIVE TRACT 1187

Zhestkov A.V., Zolotov M.O., Kadantseva E.V., Nikitina T.R., Protasov A.D.

IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF VACCINATION IN HIV-INFECTED PATIENTS 1192

Instructions to Authors 1197

Author index 1200

Subject index 1200

ИНВАЗИВНАЯ СТРЕПТОКОККОВАЯ ИНФЕКЦИЯ ГРУППЫ А С МОЛНИЕНОСНЫМ ТЕЧЕНИЕМ У ДЕТЕЙ

С.Б. Яцышина, М.В. Мамошина, М.А. Елькина, О.А. Поляева, Ю.В. Михайлова,
А.А. Шеленков, А.Е. Егорова, В.В. Малеев

ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия

Резюме. Стрептококковые инфекции группы А доминируют среди инвазивных стрептококковых инфекций. Основной их возбудитель, *Streptococcus pyogenes*, достаточно устойчив во внешней среде и имеет большое число факторов патогенности, кодируемых хромосомой или передающихся путем горизонтального переноса посредством бактериофагов. Разные генетические варианты *S. pyogenes* могут иметь различный набор факторов патогенности, который может меняться в процессе эволюции возбудителя и определяет вирулентность конкретного изолята. При коротком инкубационном периоде заболевание может протекать с развитием инвазивной инфекции и синдрома токсического шока с неблагоприятным исходом в течение 7 дней от начала заболевания. Целью этой статьи является повышение настороженности врачей в отношении стрептококковой инфекции: своевременного распознавания и проведения ранней лабораторной диагностики, от чего напрямую зависят своевременное начало адекватного лечения и исход заболевания. В статье представлены данные анализа заболеваемости стрептококковой инфекцией в России и в мире, обзор методов лабораторной диагностики и генетического типирования возбудителя. Максимальное число случаев стрептококковой септицемии в России было зарегистрировано в 2022 г., что составило 69% всех случаев за время наблюдения с 2014 по 2022 г. Также в статье приводится описание двух клинических случаев молниеносного течения инвазивной стрептококковой инфекции группы А у детей, имевших симптомы ОРВИ в дебюте заболевания. Представлены результаты различных методов лабораторной диагностики, подтверждающих диагноз. Выполнена генетическая характеристика изолятов микроорганизмов методом глубокого секвенирования ДНК. В биологическом материале пациентов (включая аутопсийный в одном случае) идентифицирован *S. pyogenes* сиквенс-тип ST-28, серотипы *emm-1.25* и *emm-1.0*. Возрастающая значимость инвазивной стрептококковой инфекции для здравоохранения России и других стран может быть связана с возможной сменой доминирующих генетических вариантов *S. pyogenes*. В связи с этим необходимы изучение циркулирующих генотипов *S. pyogenes* на постоянной основе в рамках надзора за стрептококковой инфекцией и разработка вакцины для специфической профилактики.

Ключевые слова: инвазивная стрептококковая инфекция группы А, детские инфекции, эпидемиология, лабораторная диагностика, типирование *S. pyogenes*, молниеносное течение, неблагоприятный исход.

Адрес для переписки:

Яцышина Светлана Борисовна
111123, Россия, Москва, ул. Новогиреевская, 3а, стр. 2,
ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (495) 974-96-46 (доб. 2260).
E-mail: svetlana.yatsyshina@pcr.ms

Contacts:

Svetlana B. Yatsyshina
111123, Russian Federation, Moscow, Novogireevskaya str., 3a, build. 2,
Central Research Institute of Epidemiology.
Phone.: +7 (495) 974-96-46 (add. 2260).
E-mail: svetlana.yatsyshina@pcr.ms

Для цитирования:

Яцышина С.Б., Мамошина М.В., Елькина М.А., Поляева О.А.,
Михайлова Ю.В., Шеленков А.А., Егорова А.Е., Малеев В.В. Инвазивная
стрептококковая инфекция группы А с молниеносным течением
у детей // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1009–1017.
doi: 10.15789/2220-7619-FIG-15637

Citation:

Yatsyshina S.B., Mamoshina M.V., Elkina M.A., Polyayeva O.A., Mikhailova Yu.V.,
Shelenkov A.A., Egorova A.E., Maleev V.V. Fulminant invasive group A
streptococcal infection in children // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1009–1017.
doi: 10.15789/2220-7619-FIG-15637

FULMINANT INVASIVE GROUP A STREPTOCOCCAL INFECTION IN CHILDREN

Yatsyshina S.B., Mamoshina M.V., Elkina M.A., Polyayeva O.A., Mikhailova Yu.V., Shelentov A.A., Egorova A.E., Maleev V.V.

Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-being, Moscow, Russian Federation

Abstract. Group A streptococcal infections dominate among invasive streptococcal infections, with the major causative agent, *Streptococcus pyogenes*, being quite stable in the environment and bearing a large number of chromosome encoded pathogenicity factors or transmitted by horizontal transfer through bacteriophages. Different genetic variants of *S. pyogenes* can have a different set of pathogenicity factors able to change during pathogen evolution and determine virulence level for specific isolate. With a short incubation period, the disease can proceed with developing invasive infection and toxic shock syndrome with unfavorable outcome within 7 days from disease onset. The purpose of this article is to increase the doctors' alertness to early recognition and diagnosis, which directly affects adequate treatment in a timely manner and disease outcome. The data on streptococcal morbidity in Russia and worldwide, review of laboratory diagnostic methods and pathogen genetic typing are presented. The maximum number of cases of streptococcal septicemia in Russia was registered in 2022, which accounted for 69% of all cases during the 2014–2022 observation period. The article also describes two clinical cases of fulminant invasive group A streptococcal infection in children with symptoms of acute respiratory viral infections at the onset of the disease. The results of various laboratory diagnostics methods verifying the diagnosis are presented. The genetic characterization of microbial isolates was performed by deep DNA sequencing. In the biological material from patients (including autopsy in one case), *S. pyogenes* sequence type ST-28, serotypes *emm-1.25* and *emm-1.0* were identified. The increasing importance of invasive streptococcal infection for health care in Russia and other countries may be associated with a possible change in dominating *S. pyogenes* genetic variants. In this regard, the study on circulating *S. pyogenes* genotypes on an ongoing basis as part of surveillance of streptococcal infection and development of vaccine for specific prevention are required.

Key words: *invasive group A streptococcal infection, childhood infections, epidemiology, laboratory diagnostics, S. pyogenes typing, fulminant course, poor outcome.*

Введение

Стрептококковые инфекции — это группа заболеваний, возбудителями которых являются стрептококки различных видов и серогрупп. Они характеризуются поражением верхних дыхательных путей (ангины, фарингиты, ОРЗ, отиты и др.), кожных покровов (импетиго, эктима), провоцируют развитие таких заболеваний, как скарлатина, рожа, а также способны привести к постстрептококковым аутоиммунным (гломерулонефрит, ревматизм) и токсико-септическим (синдром токсического шока, миозит и др.) осложнениям.

Стрептококковые инфекции группы А (СГАИ) занимают доминирующую позицию в патологии человека относительно других инвазивных стрептококковых инфекций, характеризуются коротким инкубационным периодом (2–5 дней). Основной их возбудитель — *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) — достаточно устойчив во внешней среде, обладает широким спектром факторов вирулентности. *S. pyogenes* циркулирует в популяции людей, передаваясь воздушно-капельным путем от больных и носителей, чаще встречается у детей в возрасте от 5 до 15 лет, пик приходится на 7–8 лет [7]. Во многих случаях *S. pyogenes* связан с легкими, саморазрешающимися инфекциями кожи и ротоглотки. Однако распространение бактерий на обычно стерильные локусы организма может привести к различным инвазивным состояниям, связанным с высокой заболеваемостью и летальностью [16]. Порядка 44% случаев

синдрома стрептококкового токсического шока (СТШ) и 19% случаев инвазивной стрептококковой инфекции в целом заканчиваются летально в течение 7 дней от начала заболевания [1]. По последним оценкам ежегодно в мире регистрируется по меньшей мере 517 000 смертей из-за заболеваний, вызываемых *S. pyogenes* [5].

В патогенезе инфекции, вызванной *S. pyogenes*, участвует большое число факторов патогенности (факторов адгезии, пирогенных экзотоксинов, экзоэнзимов и модуляторов иммунной системы человека), кодируемых хромосомой или передающихся путем горизонтального переноса посредством бактериофагов [5]. При этом разные генетические варианты *S. pyogenes* могут иметь различный набор факторов патогенности, который может меняться в процессе эволюции возбудителя и определяет вирулентность конкретного изолята.

В данной публикации проводится анализ заболеваемости, обзор методов лабораторной диагностики и генетического типирования возбудителя, а также приводится описание двух клинических случаев молниеносного течения инвазивной стрептококковой инфекции группы А (иСГАИ) у детей, результаты лабораторной диагностики и генетической характеристики возбудителя с целью повышения настороженности врачей в своевременном распознавании, проведения ранней диагностики и незамедлительного адекватного лечения, от чего напрямую зависит исход заболевания.

Анализ заболеваемости

По данным Всемирной организации здравоохранения в 2022 г. (особенно с сентября 2022 г.) в ряде европейских стран отмечался рост случаев иСГАИ у детей в возрасте до 10 лет. За тот же период было зарегистрировано несколько летальных исходов у детей в возрасте до 10 лет, связанных с иСГАИ, в том числе во Франции, Ирландии, Испании и Великобритании. В Великобритании и Франции наблюдаемое число случаев иСГАИ среди детей в несколько раз превышало допандемические показатели за аналогичный период [20].

Во Франции необычный рост числа случаев иСГАИ был отмечен с середины ноября 2022 г., а в Нидерландах Национальный институт общественного здравоохранения и охраны окружающей среды (RIVM) выявил рост числа случаев иСГАИ среди детей начиная с марта 2022 г. В Швеции, начиная с октября 2022 г., также отмечался рост случаев иСГАИ у детей в возрасте до 10 лет по сравнению с тем же периодом до пандемии COVID-19. По данным Агентства санитарно-эпидемиологической безопасности Великобритании после наблюдаемой в Англии необычно высокой заболеваемости СГАИ в летние месяцы и ее снижения в августе 2022 г. количество зарегистрированных случаев заболевания снова возросло в период с середины сентября до начала декабря и остается выше уровня, обычно наблюдаемого в это время года [21].

В Дании наблюдались исторически низкие показатели заболеваемости иСГАИ во время ограничений, связанных с COVID-19. Однако число случаев заболевания начало быстро расти в ноябре 2022 г., достигнув пика в январе 2023 г., когда ежемесячная заболеваемость СГАИ составляла 118 случаев на 100 тыс. населения, что в 3,5 раза больше, чем наблюдаемые пиковые показатели в 2018–2019 гг., а ежемесячный уровень заболеваемости иСГАИ составлял 1,7 на 100 тыс. населения, что в 3 раза превышает пиковые показатели, наблюдаемые в 2018–2019 гг. У детей в возрасте до 5 лет наблюдался высокий рост заболеваемости иСГАИ по сравнению с «доковидным» периодом. Показатели смертности были аналогичны предыдущим годам во всех возрастных группах: 30% среди людей 85 лет и старше и менее 5% среди детей в возрасте до 5 лет. Существенных различий в заболеваемости между полами в течение зимнего сезона не наблюдалось: женщины составляли 47,5% (222/467) от общего числа случаев, 41,7% (15/36) среди детей до 5 лет, 52,8% (105/199) в возрасте 5–64 лет и 44% (102/232) среди лиц в возрасте 65 лет и старше [13].

В России с 2014 г. на основании Приказа Росстата № 52 от 28.01.2014 г. в официальную регистрацию была включена стрептококковая септицемия (А40). Однако заболеваемость

стрептококковой (группы А) инфекцией по данным формы № 2 оценить невозможно в силу далеко не полной регистрации и учета всех ее случаев [2]. Вместе с тем вклад иСГАИ в заболеваемость стрептококковой септицемией (А40) также оценить не представляется возможным. Однако по имеющимся данным можно косвенно судить о росте заболеваемости иСГАИ в России в 2022 г. в сравнении с 2020–2021 гг.

Так по данным наблюдения за 2014–2022 гг. было зарегистрировано всего 194 случая стрептококковой септицемии, из них 26 случаев — со смертельным исходом. Наибольшее число случаев стрептококковой септицемии (69, 35%) было зарегистрировано в 2022 г., из них 4 случая — со смертельным исходом. Тогда как в предыдущие годы было выявлено от 8 до 26 случаев стрептококковой септицемии в год.

Данные статистического наблюдения (формы № 2) по заболеваемости стрептококковой инфекцией (впервые выявленной), скарлатинной и стрептококковой септицемией на 100 тыс. населения за период с 2014 по 2022 г. представлены на рис.

На основании этих данных в 2022 г. темп роста впервые выявленных стрептококковых инфекций составил 277%, а абсолютный прирост — 13,9 (на 100 тыс. населения).

Лабораторная диагностика

Лабораторная диагностика служит основанием для постановки диагноза СГАИ.

Культуральное исследование имеет высокую специфичность и чувствительность, однако для выделения и идентификации бактериальной культуры требуется определенное количество времени (24–48 ч, при определении чувствительности к антибиотикам вплоть до 7 дней), что удлиняет сроки до начала лечения [7].

В соответствии с «МУ 3.1.1885-04.3.1. Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор и профилактика стрептококковой (группы А) инфекции. Методические указания» с целью назначения уже на ранних этапах заболевания наиболее эффективных методов лечения, способных предупредить тяжелые последствия стрептококковых инфекций, используются методы экспресс-идентификации стрептококка группы А, с помощью которых можно в течение 15–20 мин диагностировать острую стрептококковую инфекцию без предварительного выделения чистой культуры возбудителя.

Специфичность и чувствительность современных экспресс-тестов для определения антигенов *S. pyogenes* в среднем составляют 94 и 97% соответственно [6]. Это означает, что положительным результатам экспресс-теста можно доверять, и подтвердить их культуральным иссле-



Рисунок. Заболеваемость стрептококковой инфекцией (впервые выявленной), скарлатиной и стрептококковой септициемией на 100 тыс. населения за период с 2014 по 2022 г.

Figure. 2014–2022 incidence of streptococcal infection (newly detected), scarlet fever and streptococcal septicemia per 100 thousand population

дованием не требуется из-за высокой специфичности тестов. Однако при получении отрицательного результата экспресс-теста по определению антигенов *S. pyogenes* у детей с подозрением на заболевание, вызванное β -гемолитическим стрептококком группы А, его следует подтвердить культуральным исследованием.

Существует 2 поколения экспресс-тестов [3]:

– I поколение — выявление антигена с помощью реакции агглютинации (латекс-агглютинация или коаггутинация), отличаются низкой чувствительностью и недостаточно высокой специфичностью (55 и 90% соответственно) относительно культуральных исследований;

– II поколение — выявление антигена с помощью иммуноферментного анализа или иммунохроматографии, обладают более высокими показателями чувствительности и специфичности (> 95%).

К настоящему времени в мире выпускается большое количество экспресс-тестов, предназначенных для определения антигена *S. pyogenes* (табл.).

Помимо экспресс-тестов для определения антигенов *S. pyogenes* и СГАИ можно диагностировать методами амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), обнаруживающими ДНК *S. pyogenes* с использованием диагностических наборов, разрешенных к применению в Российской Федерации в установленном порядке. Исследование и интерпретация результатов проводится согласно инструкции и другой эксплуатационной документации к набору реагентов.

Применение МАНК также позволяет определить последовательность гена *emm*, кодирующего поверхностный М-белок *S. pyogenes*, что является «золотым стандартом» молекулярного типирования стрептококков [4], поскольку гипервариабельный аминокислотный терминальный конец М-белка (40–50 аминокислот) служит главным иммуногенным эпитопом *S. pyogenes* [12].

Процедура включает выделение ДНК исследуемого изолята *S. pyogenes*, амплификацию гена *emm* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирование фрагмента амплификации методом Сэнгера в соответствии с протоколом CDC [18]. Последовательность гена *emm*

Таблица. Сравнительная характеристика иммунохроматографических экспресс-тестов* для выявления антигенов *S. pyogenes*

Table. Comparative characteristics of immunochromatographic rapid tests* for detection of *S. pyogenes* antigens

Название Name	Производитель Manufacturer	Диагностическая чувствительность, % Diagnostic sensitivity, %	Диагностическая специфичность, % Diagnostic specificity, %
РЭД стрептококк А/RED Streptococcus A	Россия/Russia	> 99	> 99
ИХА-СтрептоА/ИНА-StreptoA	Россия/Russia	98,81	99,18
Стрептатест/Streptatest	Франция/France	97	95
OSOM Strep A Test	США/USA	96	98
BinaxNOW® Strep A Card	США/USA	92	100
Hexagon Strep A	Германия/Germany	91,8	97,7
Стреп А Стик/Strep A Stick	Израиль/Israel	89,8	97

Примечание. *Зарегистрированных в Российской Федерации.

Note. *Registered in the Russian Federation.

можно также определить с помощью секвенирования нового поколения (NGS). Определение принадлежности к тому или иному серотипу полученной последовательности гена *emm* основывается на сравнении с постоянно пополняемой базой данных CDC [17].

Известно более чем 200 типов гена *emm* [15]. Показана высокая (более 80%) степень совпадения фенотипического М-типирования и типирования на основе определения гена *emm*.

Еще одной генетической характеристикой бактерий, имеющей эпидемиологическое значение, служит определение комбинации аллелей нескольких генов «домашнего хозяйства», так называемый сиквенс-тип (ST).

В случае *S. pyogenes* сиквенс-тип и серотип, определенный по гену *emm* коррелируют друг с другом [14, 15].

Описание клинических случаев иСГАИ с молниеносным течением, результаты лабораторной диагностики и генетической характеристики возбудителей

В декабре 2022 г. из Пермского края в референс-центр по мониторингу инфекций верхних и нижних дыхательных путей ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора был направлен аутопсийный (посмертный) материал для определения этиологии инфекции и проведения углубленных молекулярно-генетических исследований ее возбудителя. По данным направления секционного материала известно, что пациентом являлся мальчик 10 лет, заболевание которого началось остро, протекало молниеносно и крайне тяжело.

Поступил в стационар на 10-й день болезни с признаками прогрессирующего инфекционно-токсического шока с неопределяемым артериальным давлением, число сердечных сокращений — 104 в 1 мин, пульс на периферии слабого наполнения и напряжения, частота дыхания — 25 раз/мин, температура тела — 37,4°C. Кожные покровы были бледными с цианотичным оттенком, наблюдался выраженный акроцианоз, багрово-синюшные пятна по всему телу, на шее, груди, туловище мелкоточечная геморрагическая сыпь. В области бедер, пояснично-крестцового отдела видимых изменений не было. Слизистые ротовой полости были цианотичными, суховатыми, верхнее небо — гиперемировано, без налетов. Спонтанное дыхание сохранялось, но было неэффективным, наблюдалась одышка смешанного характера, аускультативно дыхание справа резко ослаблено. Живот был вздут, при пальпации напряжен; нижний край печени определялся на 2 см ниже края реберной дуги, селезенка не пальпи-

ровалась, при зондировании желудка отделяемое имело вид «кофейной гущи». Обращало на себя внимание нарастание органной недостаточности (SOFA — 17 баллов), сознание было сопорозным, оценка по шкале Глазго — 10 баллов. При лабораторном исследовании крови отмечалась анемия, тромбоцитопения, увеличение палочкоядерных нейтрофилов, резко выраженный метаболический ацидоз, гипоксия, гипергликемия, значительно увеличенные показатели системного воспаления. В анализе мочи определялась протеинурия, эритроциты в осадке. На рентгенограмме органов грудной клетки был выявлен двусторонний инфильтративный процесс, более выраженный в прикорневых отделах. Рентгенография тазовых суставов и бедренных костей патологии не выявила.

Из анамнеза выяснилось, что развитие ребенка протекало оптимально согласно возрасту, на диспансерном учете не состоял, прививки осуществлялись в срок, аллергоанамнез — спокоен. Со слов матери 3–4 недели до заболевания был первично вакцинирован против клещевого энцефалита, так как проживал в эндемичном районе. В окружении ребенка все были здоровы, контакт с инфекционными больными отрицался. Заболевание началось остро с повышения температуры тела до 38,5°C, которое сохранялось в течение двух дней. С 3-го по 6-й дни болезни температура нормализовалась, однако на 7-й день она внезапно повысилась до 39,5°C, на следующий день на фоне высокой температуры появились боли в области правого бедра, принимал противовоспалительные и обезболивающие препараты, в том числе и местно. При обращении за медицинской помощью в поликлинику был выставлен диагноз ОРВИ. На 10-й день болезни ночью ребенок стал беспокойным, отмечалось возбуждение, озноб, мать отметила похолодание верхних и нижних конечностей, скорой помощью доставлен в инфекционную больницу, где выставлен первоначальный диагноз «Энцефалит? Поствакцинальная реакция на прививку против клещевого энцефалита».

В связи с нарастанием угрожающего жизни состояния экстренно проводились реанимационные мероприятия, которые не дали эффекта и через 1,5 ч пребывания в стационаре констатирован смертельный исход. В направлении на патологоанатомическое исследование указан диагноз: «Внебольничная двусторонняя вирусно-бактериальная пневмония неуточненной этиологии. Сепсис. Остеомиелит бедренной кости справа?». Осложнения: Пневмоторакс справа. Дыхательная недостаточность III ст. ИТШ III ст. Отек головного мозга. Отек легких. ДВС III ст. Синдром полиорганной недостаточности. Патологоанатомический диагноз (предварительный): Сепсис. Пневмония.

В Референс-центре по мониторингу за инфекциями верхних и нижних дыхательных путей ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора проведено исследование полученных образцов методом ПЦР с использованием следующих наборов реагентов и лабораторных методик: «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL», «АмплиСенс® COVID-19-FL», «АмплиСенс® Mycoplasma pneumoniae/Chlamydia pneumoniae-FRT», «АмплиСенс® Streptococcus pyogenes-скрин/монитор-FL», «АмплиСенс® Пневмоквант-FL» для обнаружения количества ДНК *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*, «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» для обнаружения ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулазо-негативных *Staphylococcus* spp., лабораторная методика для определения количества ДНК *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *E. coli*.

Во всех образцах аутопсийного материала обнаружена ДНК *S. pyogenes*: в легком — в концентрации $6,4 \times 10^6$ копий/мл, в мягких мозговых оболочках — $1,5 \times 10^7$ копий/мл, в коре головного мозга — $4,5 \times 10^6$ копий/мл, в подкорковых структурах — $9,0 \times 10^5$ копий/мл, в стволе головного мозга — в концентрации $4,5 \times 10^5$ копий/мл. Нуклеиновые кислоты других искомым возбудителей, включая вирус SARS-CoV-2, вирусы гриппа, ДНК *M. tuberculosis* complex, ДНК *Neisseria meningitidis*, возбудителей природно-очаговых заболеваний (РНК вируса клещевого энцефалита ДНК *Borrelia* spp., ДНК *Anaplasma phagocytophilum*, ДНК *Ehrlichia muris/chaffeensis*, ДНК *Listeria monocytogenes*, ДНК *Toxoplasma gondii*, ДНК *Leptospira* spp., ДНК *Brucella* spp., ДНК *Coxiella burnetii*) обнаружены не были.

Из образцов венозной крови, взятой у пациента прижизненно, ткани легких и мозговых оболочек в бактериологической лаборатории ГБУЗ ПК «ПККИБ» позднее были выделены бактериальные культуры и также направлены для исследования в ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Пробоподготовка, полногеномное секвенирование с использованием секвенатора MiSeq и последующий биоинформатический анализ бактериальных культур проводились сотрудниками Лаборатории молекулярных механизмов антибиотикорезистентности (ЛММА) ФБУН ЦНИИЭ эпидемиологии.

Сборка и последующий биоинформатический анализ геномов исследованных бактериальных культур подтвердил идентичность и принадлежность изолятов к *S. pyogenes*, а также позволил определить сиквенс-тип ST-28 и серотип *emm-1.25*. Сиквенс-тип анализируемых образцов был определен согласно известной схеме типирования *S. pyogenes* по комбинации аллелей следующих генов домашнего хозяйства: *gki*, *gtr*, *murI*, *mutS*, *recP*,

xpt и *yqiL* [11]. С целью установления *emm*-типа и *emm*-подтипа полученные последовательно-сти сравнивали с данными, опубликованными в базе данных Streptococcus pyogenes emm sequence database [17] с помощью программы BLAST 2.

Генов резистентности к антибиотикам в обеих культурах *S. pyogenes* выявлено не было.

Весной 2023 г. в референс-центр из Республики Коми поступили образцы биоматериала, полученные от ребенка (девочки) в возрасте 14 месяцев с молниеносным течением генерализованной стрептококковой инфекции, и бактериальная культура *S. pyogenes*, выделенная из мокроты больной в лаборатории в ГБУЗРК «Республиканская инфекционная больница» на баканализаторе «Vitec 2», охарактеризованная стандартными методами.

Ребенок поступил в стационар в тяжелом состоянии, обусловленном полиорганной недостаточностью и гектической лихорадкой. Кожные покровы были цианотичными с наличием экхимозов. Дыхание — спонтанное, ослабленное справа, где выслушивались крепитирующие хрипы, артериальное давление не определялось, отмечалась тахикардия. В течении суток прогрессировала полиорганная дисфункция, нарушения метаболизма, нарастала дыхательная недостаточность и повреждения ментального статуса, в течении получаса регистрировалась остановка сердечной деятельности по типу асистолии, восстановленная в результате реанимационных мероприятий. Из анамнеза выяснилось, что за неделю до заболевания девочка контактировала со старшим ребенком в семье, у которого были признаки ОРЗ и подозревалась ангина. Заболевание началось с кашля, повышения температуры тела, слабости, на 4–5-й дни болезни отмечалась многократная рвота, одышка, беспокойство, была госпитализирована на 6-й день болезни.

После восстановления сердечной деятельности на фоне интенсивной терапии в последующие дни состояние оставалось тяжелым, регистрировался субфебрилитет, нарастала подкожная эмфизема грудной и брюшной полости, дыхание — ослабленное, крепитирующие хрипы справа, парез желудочно-кишечного тракта, наблюдались трофические изменения кожи в области дистальных отделов пальцев ног и голеностопных суставов, а также гематома с признаками нагноения на передней поверхности грудной клетки, диурез сохранялся на фоне стимуляции.

При поступлении обследование экспресс-тестом на стрептококк дало положительный результат, в анализе крови отмечалась анемия, лейкоцитоз, ускоренное СОЭ, другие показатели, характерные для выраженного системного воспаления, ДВС-синдрома, в анализе мочи — протеинурия, бактериурия, эритроциты и лейкоциты в осадке. При рентгенологическом исследовании органов

грудной клетки — двусторонняя полисегментарная деструктивная пневмония, пневмоторакс справа, подкожная эмфизема с обеих сторон. Был установлен диагноз «Стрептококковая инфекция, генерализованная форма, крайне тяжелое течение. Осложнения: сепсис, септический шок, SOFA = 16 баллов, ОРДС, острая внебольничная двусторонняя полисегментарная пневмония, деструктивная справа, бронхоплевральный свищ справа, пневмоторакс справа, миокардит, нефрит, гепатит, синдром полиорганной недостаточности, ДВС-синдром, клиническая смерть, постреанимационная болезнь». Предпринятые реанимационные и последующие лечебные мероприятия привели к выздоровлению ребенка.

При исследовании методом ПЦР образцов биологического материала (мазок из зева и мокрота), а также бактериальной культуры, обнаружена ДНК *S. pyogenes* в концентрации: мазок — $9,9 \times 10^3$ копий/мл, мокрота — $1,1 \times 10^4$ копий/мл и культура — $5,6 \times 10^3$ копий/мл. Других искомым возбудителей гриппа, ОРВИ и бактериальной пневмонии в образцах пациента обнаружено не было.

Секвенирование, сборка и последующий биоинформатический анализ генома исследованного изолята бактериальной культуры подтвердил принадлежность изолята к *S. pyogenes*, сиквенс-типу ST-28, серотипу *emm-1.0*. Генов резистентности к антибиотикам выявлено не было.

Заключение

Причины подъема вспышек СГАИ в разных странах остаются не установленными.

Не исключено, что меры социального дистанцирования, принятые во время пандемии коронавируса, могли прервать цикл распространения патогенов, а значит, повлиять на пассивную иммунизацию детей младшего возраста, снижая уровень их защищенности. Помимо этого, рост заболеваемости СГАИ и ее инвазивной формы мог быть спровоцирован появлением новых вариантов возбудителя с измененными антигенными характеристиками и свойствами вирулентности. Изменение доминирующего *emm*-серотипа или появление новых вариантов *emm*-серотипов могут служить индикатором событий такого рода.

Так на фоне роста заболеваемости и СГАИ в Нидерландах в начале 2022 г. была зафиксирована смена доминировавшего ранее среди таких форм заболевания серотипа *S. pyogenes* на *emm-4* и выявлена новая генетическая линия, которая получила название M4 NL22 [19], вытеснившая циркулировавшие до пандемии COVID-19 варианты *emm-4*.

В России ранее (в 2008–2011 гг.) среди изолятов *S. pyogenes*, выделенных от пациентов с иСГАИ, отмечалась высокая степень генетической гете-

рогенности, преобладали типы *emm-28*, *66* и *88*, реже обнаруживались *emm-1*, *64*, *84* и st1731, летальные исходы зафиксированы в случаях инфицирования *emm-1.47*, *64.0*, *66.1* и *77.0* [1].

Исследованные нами изоляты *S. pyogenes*, выделенные в биоматериале обоих детей при иСГАИ молниеносного течения, принадлежали к одному сиквенс-типу — ST28, серотипу *emm-1.0* и его подтипу *emm-1.25*. Согласно литературным данным, такие изоляты *S. pyogenes*, принадлежащие к сиквенс-типу ST28 и серотипу *emm-1.0* или его подтипам, ассоциированы с инвазивностью [9].

Как мы видим, *S. pyogenes* такого генетического варианта ST28/*emm-1.0* и его подтипов и ранее циркулировали в России и других странах мира, однако в годы после пандемии их доля относительно других генетических вариантов в циркуляции выросла.

По данным эпидемиологических исследований, проведенных в Греции, половина всех инвазивных случаев иСГАИ, идентифицированных за период 2011–2017 гг., приходилась на серотип *emm-1.0* или его подтипы [12].

Следует отметить, что во время подъема заболеваемости иСГАИ в Германии, пик которых пришелся на январь–февраль 2023 г., среди выделенных изолятов *S. pyogenes* также преобладали принадлежащие к ST28, серогруппе *emm-1.0*, составив 57% случаев заболевания [13].

Чтобы ответить на вопрос, вызвано ли повышение заболеваемости появлением новых, более вирулентных вариантов внутри генетической линии ST28/*emm-1.0* или другими причинами, необходимо определять полный спектр генов вирулентности, для чего потребуются дополнительные исследования методами полногеномного секвенирования изолятов *S. pyogenes*.

Следует иметь в виду, что начальная стадия СГАИ характеризуется гриппоподобным лихорадочным состоянием [1] и что тяжелая форма заболевания может развиваться стремительно, особенно у детей. Важно, чтобы родители и другие лица, осуществляющие уход за детьми, знали о тревожных симптомах и обращались к врачу в случае, если ребенку не становится лучше [20].

У детей с тяжелыми синдромами респираторной инфекции или при лихорадке необходимо проводить дифференциальную диагностику СГАИ (особенно при ранее перенесенной вирусной инфекции, в том числе при ветряной оспе).

Учитывая возможность тяжелых проявлений у детей, необходимо как можно скорее начинать антибактериальное лечение, чтобы минимизировать риск потенциальных осложнений у больных, а также ограничить дальнейшее распространение инфекции. Вместе с тем не стоит забывать, что некоторые изоляты *S. pyogenes* проявляют устойчивость к макролидам [12], а также сообщается о первых мутациях, кото-

рые приводят к снижению их чувствительности к пенициллину [8].

Необходимо выявлять людей, тесно контактировавших с больными иСГАИ и скарлатиной, с последующей диагностикой и ведением в соответствии с национальными клиническими протоколами.

Кроме того, важно инициировать изучение циркулирующих в России генотипов *S. pyogenes* на постоянной основе в рамках надзора за стрептококковой инфекцией.

В условиях отсутствия специфической профилактики СГАИ только раннее и активное выявление, изоляция заболевших и безотлагательное начало специфической и поддерживающей терапии помогут снизить риск тяжелой иСГАИ. В перспективе крайне необходимо создание вакцины.

Однако, несмотря на существенный прогресс в понимании молекулярного патогенеза стрептококковых инфекций группы А и доклинические испытания ряда потенциальных вакцин-кандидатов, разработать хорошо переносимую и эф-

фективную вакцину пока не удастся. Отсутствие четко сформулированных критериев иммунологической эффективности, адекватной модели заражения животных, неопределенность в отношении спроса и коммерческого интереса, опасения по поводу риска развития аутоиммунных осложнений — лишь малая часть препятствий, с которыми пришлось столкнуться разработчикам вакцин [10]. Тем не менее в настоящее время предпринимаются глобальные усилия по продолжению разработок вакцины для профилактики стрептококковых инфекций группы А [8].

Благодарности

Авторы выражают признательность сотрудникам УЗ РК «Республиканская инфекционная больница», ГБУЗ ПК «Пермская краевая клиническая инфекционная больница» и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае» за предоставленную возможность выполнения данной работы.

Список литературы/References

1. Брико Н.И., Глушкова Е.В., Носик А.Г., Дмитриев А.В., Дмитриева Н.Ф., Клейменов Д.А., Липатов К.В. Частота заболеваний, вызываемых стрептококками группы А, среди инвазивных инфекций мягких тканей, и характеристика возбудителя // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. Т. 91, № 5. С. 24–31. [Briko N.I., Glushkova E.V., Nosik A.G., Dmitriev A.V., Dmitrieva N.F., Kleimenov D.A., Lipatov K.V. Frequency of diseases caused by group A streptococci among invasive infections of soft tissues and characteristics of the causative agent. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, vol. 91, no. 5, pp. 24–31. (In Russ.)]
2. Брико Н.И., Глушкова Е.В. Состояние и тенденции эпидемической ситуации по стрептококковой (группы А) инфекции в России в последние годы // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2018. Т. 95, № 1. С. 10–16. [Briko N.I., Glushkova E.V. Status and trends of the epidemic situation of group A streptococcal (GAS) infections in Russia in recent years. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2018, vol. 95, no. 1, pp. 10–16. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2018-1-10-16
3. Профилактика стрептококковой (группы А) инфекции. Федеральные клинические рекомендации. М., 2013. 43 с. [Prevention of streptococcal (group A) infections. Federal clinical guidelines. Moscow, 2013. 43 p. (In Russ.)] URL: https://anti-microb.net/wp-content/uploads/Profilaktika-streptokokkovo%CC%86_gruppy-A_-infekcii.pdf (23.08.2023)
4. Эпидемиологический надзор и профилактика стрептококковой (группы А) инфекции: методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2005. 52 с. [Epidemiological surveillance and prevention of group A streptococcal infection: Guidelines. Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Ministry of Health of Russia, 2005 (In Russ.)] URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4737&ysclid=llnv16nvs9633412789 (23.08.2023)
5. Бурова Л.А., Тотолян Артем А. Основные факторы патогенности *Streptococcus pyogenes* // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 1. С. 33–50. [Burova L.A., Totolian A.A. Major pathogenicity factors of *Streptococcus pyogenes*. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 1, pp. 33–50. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MPF-1723
6. Острый тонзиллит и фарингит (Острый тонзиллофарингит). Клинические рекомендации. М., 2021. 51 с. [Acute tonsillitis and pharyngitis (Acute tonsillopharyngitis). Clinical guidelines. Moscow, 2021. 51 p. (In Russ.)] URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/306_2?ysclid=llnvopk3x4938558389 (23.08.2023)
7. Захарова И.Н., Бережная И.В., Майкова И.Д., Дубовец Н.Ф., Дмитриева Д.К. Острый тонзиллофарингит стрептококковой этиологии у детей: важность быстрой диагностики // Российский медицинский журнал. 2023. № 2. С. 67–71. [Zakharova I.N., Berezhnaya I.V., Maykova I.D., Dubovets N.F., Dmitrieva D.K. Acute tonsillopharyngitis of streptococcal etiology in children: the importance of rapid diagnosis. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2023, no. 2, pp. 67–71. (In Russ.)]
8. Brouwer S., Rivera-Hernandez T., Curren B.F., Harbison-Price N., De Oliveira D.M.P., Jespersen M.G., Davies M.R., Walker M.J. Pathogenesis, epidemiology and control of Group A streptococcus infection. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2023, vol. 21, no. 7, pp. 431–447. doi: 10.1038/s41579-023-00865-7
9. Chiang-Ni C., Zheng P.X., Ho Y.R., Wu H.M., Chuang W.J., Lin Y.S., Lin M.T., Liu C.C., Wu J.J. emm1/sequence type 28 strains of group A streptococci that express covR at early stationary phase are associated with increased growth and earlier SpeB secretion. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, no. 10, pp. 3161–3169. doi: 10.1128/JCM.00202-09
10. Dale J.B., Walker M.J. Update on group A streptococcal vaccine development. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 33, no. 3, pp. 244–250. doi: 10.1097/QCO.0000000000000644
11. Enright M.C., Spratt B.G., Kalia A., Cross J.H., Bessen D.E. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between emm type and clone. *Infect. Immun.*, 2001, vol. 69, no. 4, pp. 2416–2427. doi: 10.1128/IAI.69.4.2416-2427.2001

12. Grivea I.N., Syrogiannopoulos G.A., Michoula A.N., Gazeti G., Malli E., Tsilipounidaki K., Fouzas S., Anthracopoulos M.B., Petinaki E. emm Types and clusters and macrolide resistance of pediatric group A streptococcal isolates in Central Greece during 2011–2017. *PLoS One*, 2020, vol. 15, no. 5: e0232777. doi: 10.1371/journal.pone.0232777
13. Johannesen T.B., Munkstrup C., Edslev S.M., Baig S., Nielsen S., Funk T., Kristensen D.K., Jacobsen L.H., Ravn S.F., Bindslev N., Gubbels S., Voldstedlund M., Jokelainen P., Hallstrøm S., Rasmussen A., Kristinsson K.G., Fuglsang-Damgaard D., Dessau R.B., Olsén A.B., Jensen C.S., Skovby A., Ellermann-Eriksen S., Jensen T.G., Dzajic E., Østergaard C., Lomborg Andersen S., Hoffmann S., Andersen P.H., Stegger M. Increase in invasive group A streptococcal infections and emergence of novel, rapidly expanding sub-lineage of the virulent *Streptococcus pyogenes* M1 clone, Denmark, 2023. *Euro Surveill.*, 2023, vol. 28, no. 26: 2300291. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2023.28.26.2300291
14. McGregor K.F., Spratt B.G., Kalia A., Bennett A., Bilek N., Beall B., Bessen D.E. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* representing most known emm types and distinctions among subpopulation genetic structures. *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, no. 13, pp. 4285–4294. doi: 10.1128/JB.186.13.4285-4294.2004
15. McMillan D.J., Drèze P.A., Vu T., Bessen D.E., Guglielmini J., Steer A.C., Carapetis J.R., Van Melderen L., Sriprakash K.S., Smeesters P.R. Updated model of group A streptococcus M protein based on a comprehensive worldwide study. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2013, vol. 19, no. 5, pp. E222–E229. doi: 10.1111/1469-0691.12134
16. Reglinski M., Sriskandan S. Chapter 38 — *Streptococcus pyogenes*. In: *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*. Academic Press, 2015, pp. 675–716. doi: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00038-X
17. *Streptococcus* Laboratory: Blast-*emm* & *emm* databases. URL: <https://www2.cdc.gov/vaccines/biotech/strepblast.asp> (23.08.2023)
18. *Streptococcus* Laboratory: M Protein Gene (*emm*) Typing |. URL: <https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/emm-background.html> (23.08.2023)
19. Van der Putten B.C.L., Bril-Keijzers W.C.M., Rumke L.W., Vestjens S.M.T., Koster L.A.M., Willemsen M., van Houten M.A., Rots N.Y., Vlamincx B.J.M., de Gier B., van Sorge N.M. Novel *emm4* lineage associated with an upsurge in invasive group A streptococcal disease in the Netherlands, 2022. *Microb. Genom.*, 2023, vol. 9, no. 6: mgen001026. doi: 10.1099/mgen.0.001026
20. WHO. Increase in invasive Group A streptococcal infections among children in Europe, including fatalities. URL: <https://www.who.int/europe/ru/news/item/12-12-2022-increase-in-invasive-group-a-streptococcal-infections-among-children-in-europe--including-fatalities> (06.06.2023)
21. WHO. Increased incidence of scarlet fever and invasive group A streptococcus infection — multi-country. URL: <https://www.who.int/ru/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON429> (06.06.2023)

Авторы:

Яцышина С.Б., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной диагностики и эпидемиологии инфекций дыхательных путей отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Мамошина М.В., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии инфекций дыхательных путей отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Елькина М.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии инфекций дыхательных путей отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Поляева О.А., врач-эпидемиолог лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии инфекций дыхательных путей отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Михайлова Ю.В., к.б.н., зав. лабораторией молекулярных механизмов антибиотикорезистентности отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Шеленков А.А., к.ф.-м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов антибиотикорезистентности отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Егорова А.Е., научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов антибиотикорезистентности отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Малеев В.В., академик РАН, д.м.н., профессор, советник директора по научной работе ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Yatsyshina S.B., PhD (Biology), Head of Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Respiratory Infections, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

Mamoshina M.V., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Respiratory Infections, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

Elkina M.A., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Respiratory Infections, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

Polyaeva O.A., Epidemiologist, Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Respiratory Infections, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

Mikhailova Yu.V., PhD (Biology), Head of Laboratory of Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

Shelenkov A.A., PhD (Physics and Mathematics), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

Egorova A.E., Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

Maleev V.V., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Advisor to the Director for Scientific Work, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.08.2023
Отправлена на доработку 14.11.2023
Принята к печати 02.12.2023

Received 31.08.2023
Revision received 14.11.2023
Accepted 02.12.2023

ОПТИМИЗАЦИЯ СВОЙСТВ РЕАССОРТАНТНЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ОБРАТНОЙ ГЕНЕТИКИ

Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, Е.А. Баженова, Е.А. Степанова, Л.Г. Руденко

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Классическая реассортация в развивающихся куриных эмбрионах является хорошо отработанной методикой для получения штаммов живой гриппозной вакцины. Сформированные естественным путем реассортантные вакцинные штаммы характеризуются высокой репродуктивностью, генетически стабильными признаками температурочувствительности и холодоустойчивости, полностью соответствующими характеристикам донора аттенуации, участвующего в скрещивании с эпидемическим вирусом. Наряду с антигенной актуальностью, естественная реассортация гарантирует аттенуацию вакцинных штаммов, хорошую репродуктивность в клетках верхних дыхательных путей и неспособность к репродукции в нижних отделах респираторного тракта. Однако при классической реассортации скорость и эффективность получения вакцинных реассортантов в существенной степени зависят от уникальных свойств эпидемического вируса, и поэтому не могут быть стабильными. Возможности генно-инженерных технологий привлекают тем, что позволяют получать вакцинные реассортанты быстро и эффективно, снижают вероятность появления спонтанных мутаций, позволяют работать с высокопатогенными вирусами, однако вакцинный штамм лишается преимуществ естественного отбора, при котором происходит селекция наиболее жизнеспособных клонов. В настоящем исследовании представлены результаты сравнительной оценки штаммов живой гриппозной вакцины А(Н3N2), полученных параллельно методами классической реассортации и генно-инженерной сборки по критериям, подтверждающим наследование вакцинными штаммами необходимых свойств, гарантирующих их безвредность и высокую репродуктивность в куриных эмбрионах. Реассортантные штаммы для живой гриппозной вакцины, полученные обоими методами, сохраняли все аттенуирующие мутации, унаследованные от донора аттенуации, были высокорепродуктивными при оптимальной температуре, их температурочувствительность соответствовала этому признаку у донора аттенуации. Однако у штаммов, полученных методом обратной генетики, наблюдалась частичная утрата холодоустойчивости по сравнению с холодоустойчивостью донора аттенуации и реассортантов из классического скрещивания. Снижение холодоустойчивости может негативно повлиять на эффективность вакцины. Важно, что за несколько дополнительных пассажей в куриных эмбрионах при пониженной температуре холодоустойчивость вакцинного реассортантного штамма, собранного генно-инженерным путем, удалось повысить. Из этого следует, что холодоустойчивость вирусов является фенотипическим признаком, степень проявления которого зависит от температурных условий культивирования вируса. При конструировании реассортантов методами обратной генетики отсутствует необходимый селективный фактор — пониженная температура инкубации. Чтобы холодоустойчивый фено-

Адрес для переписки:

Ларионова Наталья Валентиновна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-42-92, 8 921 332-80-61. Факс: 8 (812) 234-68-68.
E-mail: nvlarionova@mail.ru

Contacts:

Natalie V. Larionova
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Academic Pavlov str., 12,
Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-42-92, +7 921 332-80-61. Fax: +7 (812) 234-68-68.
E-mail: nvlarionova@mail.ru

Для цитирования:

Ларионова Н.В., Киселева И.В., Баженова Е.А., Степанова Е.А., Руденко Л.Г. Оптимизация свойств реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины, полученных методом обратной генетики // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1018–1026. doi: 10.15789/2220-7619-OPO-17525

Citation:

Larionova N.V., Kiseleva I.V., Bazhenova E.A., Stepanova E.A., Rudenko L.G. Optimized properties of live vaccine influenza reassortant strains obtained by reverse genetics // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1018–1026. doi: 10.15789/2220-7619-OPO-17525

Работа проведена в рамках выполнения плановой темы научных исследований по государственному заданию (№ 122020300200-8 в ЕГИСУ).

The research was carried out within the framework of the planned topic of fundamental scientific research (No. 122020300200-8 in the Unified State Information System of Accounting).

тип реализовался в полной мере, необходимо дополнительное культивирование генно-инженерных реассортантов при пониженной температуре. Таким образом, метод обратной генетики с использованием плазмидной технологии дает возможность эффективной подготовки реассортантных штаммов для живой гриппозной вакцины. Важным этапом получения вакцинных штаммов с помощью генно-инженерных приемов должен быть контроль их холодоадаптированного фенотипа и, при необходимости, оптимизация холодоустойчивого фенотипа дополнительными пассажами при пониженной температуре.

Ключевые слова: вирус гриппа, живая гриппозная вакцина (ЖГВ), холодоадаптированность (*ca*-признак), температурочувствительность (*ts*-признак), аттенуация (*att*), классическая реассортация (*NR*), генно-инженерная сборка реассортантов (*RGR*).

OPTIMIZED PROPERTIES OF LIVE VACCINE INFLUENZA REASSORTANT STRAINS OBTAINED BY REVERSE GENETICS

Larionova N.V., Kiseleva I.V., Bazhenova E.A., Stepanova E.A., Rudenko L.G.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Classical reassortment in developing chicken eggs is a well-established technique for obtaining LAIV strains. Naturally generated reassortant vaccine strains are characterized by high reproductive capacity, genetically stable characteristics of temperature sensitivity and cold resistance, which correspond to the characteristics of the MDV involved in crossing with the epidemic virus. Along with antigenic relevance, natural reassortment ensures attenuation of vaccine strains, good reproduction capacity in upper respiratory tract cells and inability to reproduction in the lower respiratory tract. With classical reassortment, the speed and efficiency of obtaining vaccine reassortants largely depend on the properties of epidemic virus, and therefore cannot be stable. The potential of reverse genetics is attractive because it allows to obtain vaccine reassortants quickly and efficiently, reduce the likelihood of spontaneous mutations; however, the vaccine strain is deprived of the advantages of natural selection, in which the most viable clones are selected. This study presents the results of comparatively assessed A(H3N2) LAIVs obtained in parallel by classical reassortment and reverse genetics according to criteria confirming that vaccine strains inherit the necessary properties that guarantee their harmlessness and high reproduction in chicken embryos. Strains for LAIV obtained by both methods retained all attenuating mutations inherited from the MDV, were highly reproductive at the optimal temperature, with temperature sensitivity corresponded to the MDV. However, strains obtained by reverse genetics, was observed to have partial loss of cold resistance in comparison with that of the MDV and classical reassortants. Reduced cold adaptation may negatively affect vaccine effectiveness. It is important that after several additional passages in chicken embryos at low temperature, the cold resistance of the vaccine strain, assembled by reverse genetics, was increased. Credibly that cold resistance is a phenotypic trait, the degree of manifestation of which depends on the temperature conditions of virus multiplication. The selective factor of reduced incubation temperature is missing in reverse genetics. In order for the cold-adapted phenotype to be fully realized, additional passages at low temperature of RG-reassortants are necessary. Thus, the reverse genetics method using plasmid technology allows to effectively prepare reassortant strains for LAIV. An important stage in obtaining vaccine strains using genetic engineering techniques should be the control of their cold-adapted phenotype and its optimization by additional passages at low temperature.

Key words: influenza virus, live attenuated influenza vaccine (LAIV), cold adaptation (*ca*-sign), temperature sensitivity (*ts*-sign), attenuation (*att*), natural reassortment (*NR*), reverse genetic reassortment (*RGR*).

Введение

Живая гриппозная вакцина (ЖГВ) — эффективное и безопасное средство профилактики сезонного и пандемического гриппа [24]. Вводимая интраназально, аттенуированная вакцина имитирует естественную инфекцию и стимулирует активацию тех же звеньев иммунного ответа, что и возбудитель гриппа. Более широкий защитный эффект не только против возбудителя, к которому она получена, но и против его дрейфовых вариантов является преимуществом ЖГВ в сравнении с инактивированной вакциной [2, 8]. Дополнительным бонусом ЖГВ является легкое нетравматичное введение препарата впрыскиванием в нос.

Штамм ЖГВ представляет собой реассортант с формулой генома 6:2, содержащий 2 гена, кодирующих HA и NA актуального эпидемического вируса, что необходимо для выработки соответствующего иммунного ответа, а шесть генов, кодирующих внутренние белки — от штамма-донора аттенуации, что обеспечивает безопасность (аттенуацию, *att*) вакцинных вирусов. В результате объединения необходимых для вакцинного вируса характеристик реассортант приобретает эпидемиологическую актуальность и безвредность для человека.

В настоящее время известны два методических приема получения реассортантных штаммов для ЖГВ: 1) метод классической реассор-

тации в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) [1, 23]; 2) метод обратно-генетической сборки с использованием плазмид [10, 11, 25].

От выбранного методического приема зависит быстрота получения штаммов ЖГВ. Подготовку генно-инженерных штаммов для ЖГВ осуществляет компания MedImmune (США). Штаммы ЖГВ в России (в отделе вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины») получают методом классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах. Метод классической реассортации достаточно трудоемкий и не гарантирует быстрого получения штаммов с требуемой формулой генома [5, 17].

Опыт использования в нашей стране и в мире генно-инженерных вакцин, в частности против SARS-CoV-2 [18], открывает перспективы для использования технологии обратной генетики также при разработке штаммов ЖГВ, что может дать возможность получать штаммы ЖГВ существенно быстрее.

В настоящем исследовании представлены результаты сравнительной оценки по биологическим критериям, специфичным для ЖГВ, качества препаратов, полученных параллельно методом классической реассортации (Natural Reassortment, NR) и с помощью приемов обратной генетики (Reverse Genetic Reassortment, RGR).

Материалы и методы

Вирусы гриппа. В работе использованы вирусы гриппа А(Н3N2), полученные из Центра по контролю и предупреждению заболеваемости (CDC, США), из коллекции NIBSC (Великобритания) и центра ВОЗ (Австралия).

В представленном исследовании реассортантным штаммам ЖГВ давали названия по их эпидемическому предшественнику и методу получения реассортанта (например, штамм ЖГВ на основе вируса А/Darwin/09/2021 называли А/Darwin/2021-NR или А/Darwin/2021-RG).

Культивирование вирусов осуществляли в 10–11-дневных развивающихся куриных эмбрионах, полученных из АО «Птицефабрика Синявинская» (Ленинградская область, Россия). В зависимости от задач исследования инфицированные эмбрионы инкубировали при перmissive температуре 32–33°C в течение 2–3 суток, при пониженной температуре 26°C в течение 5–6 суток и повышенной до 39°C температуре в течение 2–3 суток, после чего эмбрионы охлаждали и собирали вирусодержащую аллантоисную жидкость. Титры вирусов рассчитывали по методу Reed & Muench [20] и выражали в lg ЭИД₅₀/мл.

Температурочувствительность вирусов гриппа оценивали в РКЭ по разности инфекционных титров при оптимальной (32–33°C) и повышен-

ной до 39°C температуре инкубации. Вирусы считали температурочувствительными, то есть демонстрирующими ts-признак, если эта разница (RCT — reproductive capacity at different temperatures) составляла не менее 4,5 lg ЭИД₅₀/мл, и температуроустойчивыми (non-ts-признак), если RCT не превышала 3,5 lg ЭИД₅₀/мл.

Степень холодоустойчивости вирусов гриппа оценивали в РКЭ по разности инфекционных титров при оптимальной (32–33°C) и пониженной до 26°C температуре инкубации. Вирусы считали холодоустойчивыми, то есть демонстрирующими non-ca-признак, если RCT₂₆ составляла не менее 4,5 lg ЭИД₅₀/мл, и холодоустойчивыми (ca-признак), если RCT₂₆ не превышала 3,5 lg ЭИД₅₀/мл.

Получение штаммов ЖГВ методом классической реассортации в РКЭ. Реассортацию эпидемических вирусов гриппа А с отечественным донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) для получения NR-вакцинных штаммов проводили в 10–11-дневных РКЭ по стандартной методике [1, 23]. Этапы работы включали: одновременное инфицирование РКЭ при оптимальной температуре рекомендованным ВОЗ актуальным эпидемическим вирусом и донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), селективные пассажи и клонирование в присутствии селективирующих факторов: пониженной до 25–26°C температуры и нейтрализующих антител против поверхностных гликопротеинов донора аттенуации, последующие 1–2 дополнительных клонирования при оптимальной температуре и накопление готового вакцинного NR-штамма.

Генно-инженерная сборка штаммов ЖГВ с помощью плазмид. RG-реассортанты получали по протоколу Isakova-Sivak с соавт. [13] с использованием комплекта плазмид, кодирующих гены донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57. Гены HA и NA эпидемически актуального вируса клонировали в вектор для обратной генетики вируса гриппа (pCIPolISapIT) по сайтам рестрикции SapI. Для этого из биоматериала, содержащего вирус гриппа, выделяли РНК набором «Ампли-Прайм РИБО-ПРЕП» (НекстБио, Россия), постановку ПЦР осуществляли с использованием набора «OneTaq One-Step» (New England Biolabs, США) и комплекта специфических праймеров, вносящих на концы сегментов сайты для клонирования генов эндонуклеазой SapI [11]. Фрагменты очищали из геля, производили рестрикцию эндонуклеазой SapI (New England Biolabs, США) и лигировали в вектор pCIPolISapIT, обработанный рестриктазой SapI, с использованием лигазы T4 (Евроген, Россия). Полученным материалом трансформировали клетки *E. coli* и производили скрининг колоний. Отбирали колонии бактерий,

содержащие плазмиды, кодирующие гены HA и NA целевого вируса, и не содержащие замен в последовательности. Из колоний накапливали биомассу и выделяли пДНК в препаративных количествах наборами «Биолабмикс макси-преп» (Новосибирск, Россия). Контроль последовательности вставки в плазмиду осуществляли методом сэнгеровского секвенирования [21] (детали метода приведены ниже).

Сборку вирусов гриппа проводили по методике [22] путем электропорации клеток Vero набором из 8 плазмид, кодирующих 6 генов донора аттенуации (PB2, PB1, PA, NP, M, NS), а также HA и NA эпидемического вируса. Трансфицированные клетки инкубировали при 33°C при 5% CO₂ в бессывороточной среде OptiPRO SFM (Thermo Fischer Scientific, США) в присутствии трипсина (Sigma, США). Через 72 ч клетки соскабливали, ресуспендировали в среде и взвесью клеток заражали РКЭ. Инкубировали РКЭ при 33°C в течение 72 ч, после чего оценивали наличие вируса методом РГА.

Скрининг NR- и RGR-штаммов для отбора кандидатов с нужной формулой генома, а также для подтверждения формулы генома, производили с использованием метода пиросеквенирования [6]. РНК из вирусосодержащей хориоаллантоисной жидкости выделяли с помощью набора «Ампли-прайм РИБО-ПРЕП» (НекстБио, Россия), проводили постановку ПЦР набором «ОТ-ПЦР Биомастер» (Биолабмикс, Россия), после чего проводили пиросеквенирование с помощью RuгоMark Q24 в соответствии с протоколом производителя.

Полногеномное секвенирование вирусов гриппа. Кандидатные штаммы в ЖГВ подвергали полногеномному секвенированию. Выделение вирусной РНК проводили при помощи набора «Ампли-прайм РИБО-ПРЕП» (НекстБио, Россия). Амплификацию генов перед секвенированием осуществляли одношаговым набором для ОТ-ПЦР «ОТ-ПЦР Биомастер» (Биолабмикс, Россия), фрагменты разделяли в 1% агарозном геле, после чего производили очистку набором «Cleanup» (Евроген, Россия). Полученные фрагменты секвенировали с помощью капиллярного секвенатора «3130xl Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США) в соответствии с протоколом производителя с использованием набора «BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Thermo Fischer Scientific, США). Анализ последовательности производили в программе Unipro Ugene [19]. Последовательности эпидемических вирусов гриппа получали из базы данных GISAID (<https://gisaid.org>).

Достоверность результатов исследований оценивали при помощи t-критерия Стьюдента для зависимых переменных.

Результаты

Проведена параллельная подготовка штаммов ЖГВ на основе разных субклад вирусов гриппа А(Н3N2) методами классической реассортации в РКЭ и обратной генетики.

Молекулярно-генетический анализ полученных NR- и RGR-штаммов подтвердил, что в их составе содержатся гены, кодирующие белки оболочки HA и NA от эпидемических вирусов и 6 генов, кодирующих внутренние белки, от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (вакцинная формула генома 6:2). Вакцинные реассортанты унаследовали от донора аттенуации мутации, определяющие температурочувствительность, холодоустойчивость и аттенуацию (ts/ca/att) (табл. 1).

Полногеномное секвенирование NR- и RGR-штаммов для ЖГВ также подтвердило сохранность у них всех аттенуирующих мутаций и отсутствие спонтанных мутаций (данные не представлены).

Сравнение ростовых характеристик реассортантных штаммов ЖГВ проводили при оптимальной (32°C) и пограничных температурах: пониженной до 26°C и повышенной до 39°C. Исследовали NR-штаммы ЖГВ, которые прошли 7–8 пассажей в РКЭ в процессе их получения, и RGR-штаммы ЖГВ, которые после сборки в клетках Vero из-за особенностей методики прошли в РКЭ всего 2–3 пассажа.

Результаты оценки характеристик репродуктивности вакцинных штаммов, полученных по NR- и RGR-технологиям, при разных температурах представлены в табл. 2.

NR- и RGR-вакцинные реассортанты имели достаточно высокие титры репродукции при оптимальной температуре 32°C и между собой отличались незначительно.

Во всех случаях репродуктивность вакцинных реассортантов превышала репродуктивность их эпидемических предшественников и соответствовала высокой инфекционной активности донора аттенуации.

Все штаммы ЖГВ-NR обладали выраженными ts- и ca-характеристиками, соответствующими ts/ca-характеристикам донора аттенуации (табл. 2). Следует заметить, что все исследованные вирусы, независимо от их принадлежности к определенной субкладе, оказались природно температурочувствительными, но в меньшей степени, чем донор аттенуации А/Ленинград/134/157 (Н2N2). Степень температурочувствительности штаммов ЖГВ-NR и ЖГВ-RGR соответствовала температурочувствительности донора аттенуации.

Что же касается оценки репродукции RG-реассортантов при пониженной температуре,

Таблица 1. Состав кодирующих мутаций во внутренних генах донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и вакцинных штаммов, полученных методами классической реассортации и обратной генетики (по данным частичного секвенирования генома)

Table 1. Composition of coding mutations in the internal genes of the MDV A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) and vaccine strains obtained by classical reassortment and reverse genetics methods (according to partial genome sequencing data)

Белок Protein	Позиция аминокислоты Amino acid position	non-ts/ non-ca Len/wt*	ts/ca Len17	Аминокислотные замены в генах, кодирующих внутренние реассортантов, полученных на основе указанных эпидемических вирусов А(Н3N2)											
				A/Singapore/ GPO454/2018		A/Kansas/ 14/2017		A/Brisbane/ 190/2017		A/Switzerland/ 8060/2017		A/Abu Dhabi/ 240/2018		A/SouthAustralia/ 34/2019	
		NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR
PB2	478	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
PB1	265	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn
	591	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile
PA	28	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
	341	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
NP	ген NP донора аттенуации Len17 не содержит кодирующих мутаций/the NP gene of the MDV Len17 does not contain coding mutations														
M1	15	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
M2	86**	Ala	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn
NS2	100	Met	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile

Примечания. *Len/wt — эпидемический вирус А/Ленинград/134/57 (H2N2) является «диким» предшественником донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Len17). **Популяция донора аттенуации Len17 гетерогенна по этой позиции, часть ее не содержит мутацию Ala-86-Thr [13, 15].
Notes. *Len/wt — epidemic virus A/Leningrad/134/57 (H2N2) is a "wild" precursor of the MDV A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) (Len17). **The population of MDV Len17 is heterogeneous for this position; part of it does not contain the mutation Ala-86-Thr [13, 15].

то все они отличались сниженной холодоустойчивостью по сравнению с холодоустойчивостью донора аттенуации и реассортантов из классического NR-скрещивания. Четыре из семи RGR-штаммов для ЖГВ по использованным критериям, прописанным в разделе «Материалы и методы», не могли быть отнесены к обладающим са-фенотипом, у остальных трех сохранилась холодоустойчивость, но она была снижена в сравнении со штаммами ЖГВ-NR и с донором аттенуации. В среднем, штаммы ЖГВ-RGR были менее холодоустойчивы на 0,5–2,1 lg ЭИД₅₀ по сравнению со штаммами ЖГВ-NR. Все эпидемические вирусы обладали non-са-фенотипом.

Поскольку уровень холодоустойчивости RG-вакцинных штаммов не соответствовал стандартным значениям, принятым для характеристики штаммов ЖГВ [5], на модели вакцинного реассортанта А/Darwin/09/2021-RG (H3N2) была исследована возможность оптимизировать са-фенотип штаммов ЖГВ-RG. Были проведены его последовательные пассажи в РКЭ при 26°C. У штамма ЖГВ на основе А/Darwin/09/2021-RG (H3N2), который характеризовался недостаточной холодоустойчивостью (RCT26 = 4,6 lg ЭИД₅₀), постепенно повышалась способность к репродукции при 26°C, и за три пассажа в РКЭ при пониженной температуре инкубации его са-фенотип практически сравнялся с са-фенотипом NR-аналога (рис.).

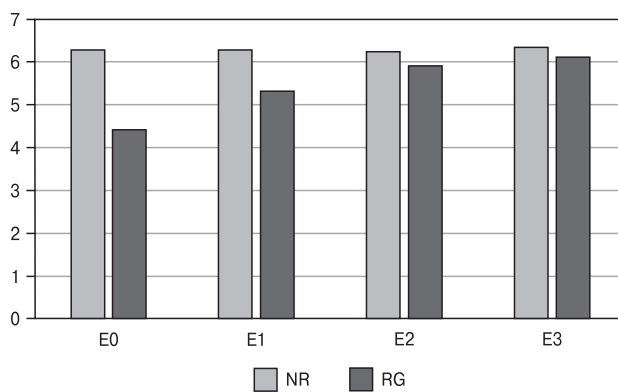


Рисунок. Изменение са-фенотипа штаммов ЖГВ-NR и ЖГВ-RG на основе эпидемического вируса А/Darwin/09/2021 (H3N2) при последовательных пассажах в развивающихся куриных эмбрионах при 26°C

Figure. Changes in the ca-phenotype of LAIV-NR and LAIV-RG strains based on A/Darwin/09/2021 (H3N2) wild type virus during successive passages in developing chicken embryos at 26°C

Примечание. По оси абсцисс: число дополнительных пассажей штаммов ЖГВ в РКЭ при 26°C. По оси ординат: инфекционный титр вируса в РКЭ при 26°C, lg ЭИД₅₀/мл.
Note. X-axis: the number of additional passages of LAIV strains in eggs at 26°C. On the y-axis: infectious titer of the virus in eggs at 26°C, lg EID₅₀/mL.

Таблица 2. Репродуктивные свойства реассортантных штаммов сезонной ЖГВ, подготовленных методами классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах и генно-инженерной сборки

Table 2. Characteristics of reproductive capacities of seasonal LAIV reassortant strains prepared by classical reassortment in developing chicken embryos and reverse genetic method

Вирус A(H3N2) Virus A(H3N2)	Клада Clade	WT*/Реассортант WT*/Reassortant	Инфекционный титр (lg ЭИД ₅₀ /мл)**** Infectious titer (lg EID ₅₀ /mL)****			РСТ***** (lg ЭИД ₅₀) RСТ***** (lg EID ₅₀)		Фенотип Phenotype	
			32°C	26°C	39°C	26°C	39°C		
A/Singapore/ GPO454/2018	3C.2a1	WT	7,8±0,1	2,0±0,1	1,7±0,3	5,8	6,1	non-ca	ts
		NR**	8,6±0,2	6,2±0,1	1,2±0,0	2,4	7,4	ca	ts
		RGR***	9,1±0,2	5,7±0,2	≤ 1,2±0,0	3,4	≥ 7,9	ca	ts
A/Kansas/ 14/2017	3C.3a	WT	7,7±0,3	2,0±0,2	2,1±0,1	5,6	≥ 5,6	non-ca	ts
		NR	8,0±0,2	4,9±0,3	≤ 1,2±0,0	3,1	≥ 6,8	ca	ts
		RGR	8,0±0,2	3,4±0,1	≤ 1,2±0,0	4,6	≥ 6,8	non-ca	ts
A/Brisbane/ 190/2017	3C.2a2	WT	7,7±0,3	2,0±0,1	1,2±0,0	5,7	≥ 6,5	non-ca	ts
		NR	8,5±0,1	5,5±0,2	≤ 1,2±0,0	3,0	≥ 7,3	ca	ts
		RGR	7,9±0,2	4,7±0,1	≤ 1,2±0,0	3,2	≥ 6,7	ca	ts
A/Switzerland/ 8060/2017	3C.2a2	WT	6,8±0,4	1,2±0,1	2,5±0,2	5,6	4,3	non-ca	ts
		NR	9,2±0,1	6,2±0,2	1,2±0,1	3,0	8,0	ca	ts
		RGR	9,2±0,1	5,5±0,2	≤ 1,2±0,0	3,7	≥ 8,0	non-ca	ts
A/Abu Dhabi/ 240/2018	3C.2a1b	WT	6,8±0,2	2,0±0,1	2,2±0,3	4,8	4,6	non-ca	ts
		NR	9,1±0,1	6,7±0,1	1,7±0,2	2,4	7,4	ca	ts
		RGR	8,5±0,1	4,0±0,2	1,2±0,1	4,5	7,3	non-ca	ts
A/South Australia/ 34/2019	3C.2a1b	WT	7,7±0,1	2,7±0,1	1,2±0,0	5,0	≥ 6,5	non-ca	ts
		NR	8,2±0,2	6,0±0,4	≤ 1,2±0,0	2,2	≥ 7,0	ca	ts
		RGR	8,9±0,1	6,2±0,2	≤ 1,2±0,0	2,7	≥ 7,7	ca	ts
A/Darwin/ 09/2021	3C.2a1b.2a.2	WT	8,2±0,2	2,2±0,0	1,7±0,4	6,0	6,5	non-ca	ts
		NR	9,2±0,1	6,3±0,2	1,2±0,0	2,9	8,0	ca	Ts
		RGR	9,0±0,1	4,4±0,2	1,2±0,1	4,6	7,8	non-ca	ts
A/Leningrad/ 134/17/57 (H2N2) MDV		NR	9,4±0,1	7,4±0,0	≤ 1,2±0,0	2,0	≥ 7,4	ca	ts

Примечание. *WT — (wild type) эпидемический вирус; **NR — (Natural Reassortment) полученные классическим методом реассортации; ***RGR — (Reverse Genetic Reassortment) полученные обратным-генетическим методом; ****ЭИД₅₀/мл — 50% эмбриональная инфекционная доза вируса; *****RCT — (Reproductive Capacity at Different Temperatures) разность репродуктивной активности при оптимальной 32°C и при пониженной до 26°C температуре.

Note. *WT — wild type virus; **NR — (Natural Reassortment) obtained by classical reassortment method; ***RGR — (Reverse Genetic Reassortment) obtained using reverse genetic method; ****EID₅₀ — 50% embryo infective dose; *****RCT — (Reproductive Capacity at Different Temperatures) the difference in reproductive capacity at an optimal temperature of 32°C and at a temperature reduced to 26°C.

Обсуждение

Штаммы вируса гриппа А(Н3N2) за длительный период циркуляции выработали разнообразные антигенные и генетические стратегии ухода от популяционного иммунитета. Произошли изменения в их взаимодействии с птичьими и человеческими клеточными рецепторами, в этом взаимодействии вирусная NA научилась замещать HA, что приводит к сложностям с накоплением вирусов, подбором эритроцитов для антигенного анализа, искажается антигенная характеристика изолятов в серологических реакциях [7]. В результате этого вирусы А(Н3N2) стали самыми проблемными при подготовке на их основе штаммов ЖГВ методом классической реассортации. Поэтому в настоящей работе для сравнительной оценки методов получения вакцинных штаммов были выбраны именно вирусы А(Н3N2).

Метод классической реассортации в РКЭ позволяет получать сформированные естественным путем высокорепродуктивные реассортантные штаммы для живой гриппозной вакцины с генетически стабильными характеристиками температурочувствительности и холодоустойчивости, полностью соответствующими характеристикам донора аттенуации. Однако при классической реассортации скорость и эффективность получения реассортантов с необходимым составом генома не могут быть стабильными, поскольку в существенной степени зависят от уникальных свойств участвующего в скрещивании эпидемического вируса.

Приемы обратной генетики позволяют получать вакцинные реассортанты быстро и эффективно, снижают вероятность появления спонтанных мутаций, позволяют работать с высокопатогенными вирусами, однако вакцинный штамм лишается преимуществ естественного отбора, при котором происходит селекция наиболее жизнеспособных клонов, способных, в частности, эффективно размножаться в РКЭ [4, 25].

При отборе реассортантных штаммов для ЖГВ существуют нормативные требования, касающиеся высокой репродуктивности, безопасности и иммуногенности. В настоящем исследовании изучены признаки репродуктивности при оптимальной температуре, температурочувствительности и холодоустойчивости (ts/са), которые являются неотъемлемыми характеристиками вакцинных реассортантов и служат маркерами их аттенуации.

Наши исследования показали, что оба методических приема получения вакцинных штаммов NR и RGR позволяют получать высокорепродуктивные при оптимальной температуре штаммы ЖГВ. При обоих способах получения вакцинных штаммов обеспечивается генети-

ческая стабильность аттенуирующих мутаций, а ts-фенотип штаммов ЖГВ-RGR в полной мере соответствует ts-фенотипу штаммов ЖГВ-NR.

Холодоустойчивость является неотъемлемым свойством доноров аттенуации и передается вакцинным штаммам с генами, кодирующими внутренние белки. Этот признак является важным фактором, способствующим хорошей репликации вакцинных реассортантов в клетках верхних отделов респираторного тракта. Неожиданностью явилась частичная потеря свойства холодоустойчивости у RG-реассортантов на основе вирусов гриппа А(Н3N2) по сравнению со штаммами ЖГВ-NR и с донором аттенуации. Снижение показателя холодоустойчивости для вирусов гриппа А(Н3N2) составляло от 0,5 до 2,1 lg ЭИД₅₀ у разных штаммов. Интересно, что снижение са-фенотипа было отмечено ранее при конструировании химерных штаммов вируса гриппа, когда в качестве вектора использовали ЖГВ-RGR. При этом изменение са-фенотипа не снижало аттенуацию химерного вакцинного штамма для мышей [12].

Частичная утрата са-фенотипа штаммами, полученными генно-инженерными методами, может повлиять на эффективность ЖГВ. Однако представленные в работе результаты быстрой и эффективной адаптации RG-реассортанта А(Н3N2) к репродукции при 26°C свидетельствуют о том, что холодоустойчивость легко удается повысить за несколько последовательных пассажей при пониженной температуре.

В связи с выявленным снижением холодоустойчивости сконструированных методами обратной генетики вакцинных штаммов, важно отметить, что исследования отечественного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), как и доноров для американской ЖГВ на основе вирусов А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) и В/Энн Арбор/1/66, показали наличие взаимосвязи между аттенуацией для хорьков и ts-фенотипом реассортантов, тогда как между аттенуацией и са-фенотипом такой взаимосвязи не наблюдали [9, 14, 16].

В вирусологии зачастую используют понятие «фенотип», объявляя фенотипическим признак вируса, который на самом деле таковым не является, а является генетическим, обусловленным наследованием определенных мутаций в геноме. Так, признаки ts и са называют фенотипическими, в то время как за признаком температурочувствительности не наблюдается фенотипических проявлений, признак остается стабильным и неизменным в любых условиях культивирования. Ранее нами было показано, что температурочувствительные вакцинные штаммы не способны к репродукции при повышенных температурах и не меняют своих свойств в непермиссивных для них условиях повышенной температуры [3].

Представленные аргументы позволяют предположить, что признак холодоустойчивости действительно проявляет себя как фенотипический, способный подстраиваться к условиям окружающей среды. Признак са имеет норму реакции, зависящую от температурных условий культивирования вируса. Проявление признака снижается при снижении роли участия окружающей среды. При конструировании реассортантов ЖГВ методами обратной генетики отсутствует селективный фактор — пониженная температура. Чтобы са-фенотип у ЖГВ-RG реализовался в полной мере, необходимо дополнительное культивирование вируса при пониженной температуре.

Одна из причин, по которой традиционный метод классической реассортации при получении штаммов ЖГВ-NR предпочтительней для качества вакцинного препарата в сравнении с RG-технологией, заключается в том, что он предполагает естественный отбор таких вариантов, которые имеют констелляцию генов, оптимизирующую ростовые свойства вируса в РКЭ, что является важнейшим аспектом производственного процесса. Отсутствие естественной селекции может отрицательно сказываться на биологических характеристиках RG-реассортантов для ЖГВ. Однако новаторские RG-технологии бесспорно являются при-

влекательными, поскольку позволяют гарантированно получать реассортантные вирусы вакцинной формулы генома, свободные от ненужных мутаций, которые могут появиться в геноме в результате серийного пассирования в РКЭ. Представленные данные подтверждают перспективность RG-вакцинных штаммов ЖГВ, однако их подготовка должна осуществляться под строгим контролем и, при необходимости, сопровождаться коррекцией фенотипа полученных реассортантов.

Таким образом, метод обратной генетики с использованием плазмидной технологии дает возможность эффективной подготовки реассортантных штаммов для ЖГВ. По характеристикам репродукции при повышенной и оптимальной температурах штаммы ЖГВ-RG сравнимы с вакцинными штаммами, полученными в результате классической реассортации, что гарантирует их аттенуацию и важную для производства высокую репродуктивность. Стабильности генотипа RG реассортантов оказалось недостаточно для оптимального проявления их са-фенотипа. Важным этапом получения штаммов ЖГВ-RG должен быть контроль их холодадаптированного фенотипа и, при необходимости, оптимизация са-фенотипа дополнительными пассажами в РКЭ при пониженной температуре.

Список литературы/References

1. Александрова Г.И. Применение метода генетической рекомбинации для получения вакцинных штаммов вируса гриппа // Вопросы вирусологии. 1977. Т. 22, № 4. С. 387–395. [Alexandrova G.I. Use of the genetic recombination method for obtaining vaccinal strains of the influenza virus. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1977, vol. 22, no. 4, pp. 387–395. (In Russ.)]
2. Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа. СПб.: Наука, 1994. 152 с. [Alexandrova G.I., Klimov A.I. Live influenza vaccine. *St. Petersburg: Nauka*, 1994. 152 p. (In Russ.)]
3. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Исакова И.Н., Руденко Л.Г. Генетическая стабильность холодадаптированных вирусов гриппа // Вопросы вирусологии. 2006. Т. 51, № 4. С. 13–16. [Kiseleva I.V., Larionova N.V., Isakova I.N., Rudenko L.G. Genetic stability of cold-adapted influenza viruses. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2006, vol. 51, no. 4, pp. 13–16. (In Russ.)]
4. Киселева И.В., Руденко Л.Г. Разработка реассортантных гриппозных вакцин: классическое скрещивание или обратная генетика? // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 209–218. [Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Development of reassortant influenza vaccines: classical reassortment or reverse genetics? *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 209–218. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-DOR-2449
5. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Баженова Е.А., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г. Влияние биологических свойств сезонных вирусов гриппа на эффективность подготовки штаммов живой гриппозной вакцины // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019. № 5. С. 24–34. [Larionova N.V., Kiseleva I.V., Bazhenova E.A., Grigorieva E.P., Rudenko L.G. The influence of seasonal influenza viruses biological features on the effectiveness of development strains for live influenza vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 5, pp. 24–34. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2019-5-24-34
6. Степанова Е.А., Крутикова Е.В., Киселева И.В., Руденко Л.Г. Разработка протокола пиросеквенирования для анализа происхождения генов реассортантов при подготовке штаммов живой гриппозной вакцины // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2018. Т. 36, № 2. С. 101–107. [Stepanova E.A., Krutikova E.V., Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Development of pyrosequencing-based assay for analyzing the origin of genes in preparing reassortant LAIV candidates. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2018, vol. 36, no. 2, pp. 101–107. (In Russ.)] doi: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-98-103
7. Allen J.D., Ross T.M. H3N2 influenza viruses in humans: viral mechanisms, evolution, and evaluation. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2018, vol. 14, no. 8, pp. 1840–1847. doi: 10.1080/21645515.2018.1462639.
8. Cheng X., Zengel J.R., Suguitan A.L. Jr., Xu Q., Wang W., Lin J., Jin H. Evaluation of the humoral and cellular immune responses elicited by the live attenuated and inactivated influenza vaccines and their roles in heterologous protection in ferrets. *J. Infect. Dis.*, 2013, vol. 208, no. 4, pp. 594–602. doi: 10.1093/infdis/jit207

9. Herlocher M.L., Clavo A.C., Maassab H.F. Sequence comparisons of A/AA/6/60 influenza viruses: mutations which may contribute to attenuation. *Virus Res.*, 1996, vol. 42, no. 1–2, pp. 11–25. doi: 10.1016/0168-1702(96)01292-0
10. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, no. 11, pp. 6108–6113. doi: 10.1073/pnas.100133697
11. Hoffmann E., Krauss S., Perez D., Webby R., Webster R.G. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*, 2002, vol. 20, no. 25–26, pp. 3165–3170. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00268-2
12. Isakova-Sivak I., Matyushenko V., Stepanova E., Matushkina A., Kotomina T., Mezhenkaya D., Prokopenko P., Kudryavtsev I., Kopeykin P., Sivak K., Rudenko L. Recombinant live attenuated influenza vaccine viruses carrying conserved T-cell epitopes of human adenoviruses induce functional cytotoxic T-cell responses and protect mice against both infections. *Vaccines (Basel)*, 2020, vol. 8, no. 2: 196. doi: 10.3390/vaccines8020196
13. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Kiseleva I., Heldens J.G., den Bosch H., Klimov A., Rudenko L., Cox N.J., Donis R.O. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). *Virology*, 2011, vol. 412, no. 2, pp. 297–305. doi: 10.1016/j.virol.2011.01.004
14. Jin H., Lu B., Zhou H., Ma C., Zhao J., Yang C.F., Kemble G., Greenberg H. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *Virology*, 2003, vol. 306, no. 1, pp. 18–24. doi: 10.1016/s0042-6822(02)00035-1
15. Klimov A.I., Kiseleva I.V., Desheva J.A., Cox N.J., Alexandrova G.I., Rudenko L.G. Live attenuated reassortant influenza vaccine prepared using A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) donor strain is genetically stable after replication in children 3–6 years of age. *International Congress Series*, 2001, vol. 1219, no. 2001, pp. 951–954. doi: 10.1016/S0531-5131(01)00020-6
16. Klimov A.I., Kiseleva I.V., Alexandrova G.I., Cox N.J. Genes coding for polymerase proteins are essential for attenuation of the cold-adapted A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) influenza virus. *International Congress Series*, 2001, vol. 1219, no. 2001, pp. 955–959. doi: 10.1016/S0531-5131(01)00369-7
17. Kiseleva I. Current opinion in LAIV: a matter of parent virus choice. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 12: 6815. doi: 10.3390/ijms23126815
18. Kurhade C., Xie X., Shi P.Y. Reverse genetic systems of SARS-CoV-2 for antiviral research. *Antiviral. Res.*, 2023, vol. 210: 105486. doi: 10.1016/j.antiviral.2022
19. 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/bis091
20. Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.*, 1938, vol. 27, iss. 3, pp. 493–497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
21. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463
22. Smolonogina T.A., Isakova-Sivak I.N., Kotomina T.S., Evsina A.S., Stepanova E.A., Prokopenko P.I., Leontieva G.F., Suvorov A.N., Rudenko L.G. Generation of a vaccine against group B streptococcal infection on the basis of a cold-adapted influenza A virus. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, 2019, vol. 34, pp. 25–34. doi:10.3103/S0891416819010087
23. Wareing M.D., Marsh G.A., Tannock G.A. Preparation and characterization of attenuated cold-adapted influenza A reassortants derived from the A/Leningrad/134/17/57 donor strain. *Vaccine*, 2002, vol. 20, no. 16, pp. 2082–2090. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00056-7
24. WHO. Initiative for Vaccine Research (IVR). Options for Live Attenuated Influenza Vaccines (LAIV) In the Control of Epidemic and Pandemic Influenza 12–13 June 2007. URL: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/meeting_120707/en/index.html (18.10.2023)
25. Wong S.S., Webby R.J. Traditional and new influenza vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, vol. 26, no. 3, pp. 476–492. doi: 10.1128/CMR.00097-12

Авторы:

Ларионова Н.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Киселева И.В., д.б.н., профессор, зав. лабораторией общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Баженова Е.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Степанова Е.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Руденко Л.Г., д.б.н., профессор, зав. отделом вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Larionova N.V., DSc (Biology), Leading Researcher, Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Kiseleva I.V., DSc (Biology), Professor, Head of Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Bazhenova E.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Stepanova E.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Rudenko L.G., DSc (Biology), Professor, Head of the A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.11.2023
 Принята к печати 05.12.2023

Received 05.11.2023
 Accepted 05.12.2023

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ИНТЕРФЕРОНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ТЯЖЕСТЬ COVID-19 И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ

Е.А. Кригер¹, О.В. Самодова¹, О.А. Свитич^{2,4}, Р.В. Самойликов², Е.А. Меремьянина^{2,5},
Л.В. Иванова¹, Н.А. Бебякова¹, Е.Н. Ильина³, А.В. Павленко³, Ю.И. Есин³,
А.Л. Архипова³, С.Н. Ковальчук³, А.В. Кудрявцев¹

¹ ФГБОУ ВО Северный государственный медицинский университет Минздрава России, г. Архангельск, Россия

² ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

³ ФБУН НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия

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

⁵ ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования МЗ РФ, Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Однонуклеотидные замены в структуре генов, ассоциированные с изменением конформации белка-рецептора или экспрессии рецепторов к интерферонам, могут объяснить различия в восприимчивости и тяжести COVID-19, наряду с общеизвестными факторами риска. Цель: изучение взаимосвязи между полиморфными вариантами генов интерфероновых рецепторов, тяжестью течения COVID-19 и распространенностью генов антибиотикорезистентности в микробиоте кишечника. *Материалы и методы.* Проведено исследование с включением случайной выборки населения Архангельска в возрасте от 42 до 76 лет (n = 305). Процедура исследования включала сбор данных о COVID-19 из Федерального регистра переболевших COVID-19, забор крови для серологического исследования на наличие антител к SARS-CoV-2, исследование полиморфных маркеров рецепторов к интерферонам и сбор образцов кала для выявления генов антибиотикорезистентности. *Результаты.* В течение 12–15 месяцев пандемии COVID-19 17,4% участников исследования перенесли COVID-19 с симптомами, 32,8% болели бессимптомно. К осени 2022 г. доля участников, переболевших с симптомами, увеличилась до 36,4%, а доля переболевших бессимптомно — до 61,3%. Выявлена взаимосвязь между генотипом СС варианта rs2257167 гена *IFNAR1*, наличием аллеля Т варианта rs2229207 гена *IFNAR2*, гаплотипа ССТТ и манифестным течением COVID-19. Выявлена взаимосвязь между гаплотипом GСТС, наличием пневмонии и тяжестью течения COVID-19. В ноябре 2022 г. резистентность к макролидам наблюдалась в 98,4% случаев, устойчивость к бета-лактамам — в 26,9%, резистентность к гликопептидам — в 13,8%. Резистентность к трем классам антибиотиков наблюдалась у 4,9% обследованных и чаще выявлялась у лиц с гаплотипом ССТТ. Гены, кодирующие бета-лактамазы, чаще выявлялись у лиц с гаплотипом GСТС, чаще болевших COVID-19 с пневмонией и получавших стационарное лечение. Гены резистентности к гликопептидам были ассоциированы с генотипом СС варианта rs2257167 гена *IFNAR1*. *Вывод.* Таким образом,

Адрес для переписки:

Кригер Екатерина Анатольевна
163000, Россия, г. Архангельск, Троицкий пр., 51,
Северный государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (950) 963-57-11 (моб.).
E-mail: kate-krieger@mail.ru

Contacts:

Ekaterina A. Krieger
163000, Russian Federation, Arkhangelsk, Troitski pr., 51,
Northern State Medical University.
Phone: +7 (950) 963-57-11 (mobile).
E-mail: kate-krieger@mail.ru

Для цитирования:

Кригер Е.А., Самодова О.В., Свитич О.А., Самойликов Р.В., Меремьянина Е.А., Иванова Л.В., Бебякова Н.А., Ильина Е.Н., Павленко А.В., Есин Ю.И., Архипова А.Л., Ковальчук С.Н., Кудрявцев А.В. Влияние полиморфных вариантов генов интерфероновых рецепторов на тяжесть COVID-19 и антибиотикорезистентность // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1027–1039. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-17537

Citation:

Krieger E.A., Samodova O.V., Svitich O.A., Samoilikov R.V., Meremianina E.A., Ivanova L.V., Bebyakova N.A., Ilna E.N., Pavlenko A.V., Esin Yu.I., Arkhipova A.L., Kovalchuk S.N., Kudryavtsev A.V. The impact of polymorphic variants of interferon receptor genes on COVID-19 severity and antibiotic resistance // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1027–1039. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-17537

выявлены генетические детерминанты восприимчивости, манифестного течения и тяжести COVID-19. Взаимосвязь полиморфных вариантов генов интерфероновых рецепторов и тяжести течения COVID-19 может использоваться для выявления людей с генетической предрасположенностью к тяжелому течению инфекции и определения приоритетных групп для проведения вакцинации, в том числе для профилактики антибиотикорезистентности при осложненном течении вирусных инфекций.

Ключевые слова: полиморфные варианты, интерфероновые рецепторы, антибиотикорезистентность, COVID-19, генетические маркеры, тяжесть COVID-19.

THE IMPACT OF POLYMORPHIC VARIANTS OF INTERFERON RECEPTOR GENES ON COVID-19 SEVERITY AND ANTIBIOTIC RESISTANCE

Krieger E.A.^a, Samodova O.V.^a, Svitich O.A.^{b,d}, Samoilikov R.V.^b, Meremianina E.A.^{b,c}, Ivanova L.V.^a, Bebyakova N.A.^a, Ilina E.N.^c, Pavlenko A.V.^c, Esin Yu.I.^c, Arkhipova A.L.^c, Kovalchuk S.N.^c, Kudryavtsev A.V.^a

^a Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation

^b I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^c Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russian Federation

^d I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

^e Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

Abstract. *Background.* Single nucleotide substitutions in gene sequence associated with conformational changes in protein receptor or in expression of interferon receptors may explain variations in human susceptibility to infection and severity of COVID-19 along with other well-known risk factors. The study aimed to investigate associations between polymorphic variants of interferon receptor genes, COVID-19 severity and prevalence of antibiotic resistance genes in the gut microbiota. *Materials and methods.* The study was conducted using a random sample of Arkhangelsk population aged 42 to 76 years (n = 305). The research involved gathering COVID-19 data from the Federal Register, conducting blood tests for SARS-CoV-2 antibodies and polymorphic interferon receptor gene variants, and identifying antibiotic resistance genes in stool samples. *Results.* During the first 12–15 months of the COVID-19 pandemic, 17.4% of the study participants had symptomatic COVID-19, while 32.8% were asymptomatic. By the Autumn of 2022, symptomatic COVID-19 cases rose up to 36.4%, while asymptomatic cases increased to 61.3%. We reveal an association between the CC genotype of the *IFNAR1* gene rs2257167 variant, the presence of the T allele of *IFNAR2* gene rs2229207 variant, the CCTT haplotype and symptomatic COVID-19. The GCTC haplotype was associated with pneumonia and COVID-19 severity. In November 2022, macrolide resistance genes were observed in 98.4% of cases, whereas those to beta-lactams and glycopeptides — in 26.9% and 13.8% cases, respectively. Resistance to three classes of antibiotics was observed in 4.9% and was more frequently detected in individuals with the CCTT haplotype. Genes encoding beta-lactamases were more often found in individuals with the GCTC haplotype, those who had COVID-19 with pneumonia and those who received hospital treatment. Glycopeptide resistance genes were associated with the CC genotype of the rs2257167 variant of *IFNAR1* gene. *Conclusion.* We identified genetic determinants of susceptibility, symptomatic infection and COVID-19 severity. The associations between polymorphic variants of interferon receptor genes and COVID-19 severity can be used to identify people with a genetic predisposition to severe infection and to determine priority groups for vaccination, including the prevention of antibiotic resistance in complicated course of viral infections.

Key words: polymorphic variants, interferon receptors, antibiotic resistance, COVID-19, genetic markers, COVID-19 severity.

Введение

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) — мультисистемное заболевание с широким спектром клинических проявлений, от бессимптомного инфицирования до крайне тяжелого течения, требующего проведения интенсивной терапии [29]. Тяжесть COVID-19 зависит от многих факторов, в том числе от штамма SARS-CoV-2, инфицирующей дозы вируса, наличия у пациента факторов риска, таких, как пожилой возраст, сердечно-сосудистые заболевания, хронические заболевания легких, сахарный диабет, ожирение [25]. Немаловажную роль в восприимчивости к SARS-CoV-2 играют иммунологические и ге-

нетические детерминанты. Тяжесть заболевания может быть обусловлена индивидуальными вариациями в структуре генов, отвечающих за иммунный ответ [24]. Особенное значение в защите против SARS-CoV-2 имеют факторы, обуславливающие интерфероновый ответ на инфекцию: интерфероны I типа являются основным связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунным ответом [19]. Интерфероны I типа (IFN α/β) продуцируются преимущественно эпителиальными и дендритными клетками в течение первых 24 часов после инфицирования [6]. Противовирусное действие интерферонов I типа осуществляется за счет активации транскрипции генов ряда противовирусных белков, подавляющих репликацию

вируса в пораженных клетках и препятствующим инфицированию соседних клеток [16, 18]. Интерфероны II типа ($IFN\gamma$) синтезируются к 3–5 дню клетками иммунной системы и обеспечивают иммунорегуляторную функцию [5]. $IFN\gamma$ стимулирует как врожденные, так и адаптивные иммунные реакции, повышая устойчивость клеток к вирусной инфекции и активируя воспалительный ответ [14].

Свои функции интерфероны I и II типа реализуют путем связывания с трансмембранными рецепторами на клеточной поверхности, что приводит к активации и экспрессии интерферон-стимулируемых генов. Рецепторы к интерферонам I типа, состоящие из двух субъединиц — $IFNAR1$ и $IFNAR2$, экспрессируются большинством типов клеток, тогда как рецепторы интерферонов II типа, в частности $IFNGR1$, — преимущественно клетками иммунной системы [20].

Выраженность противовирусных иммунных реакций, опосредованных интерферонами, коррелирует с концентрацией интерфероновых рецепторов на поверхности клеток [11]. Количество и структура интерфероновых рецепторов во многом зависит от генетических особенностей индивида, что в свою очередь влияет на выраженность иммунного ответа. Самые распространенные изменения в гене человека — это полиморфизмы, которые заключаются в изменении одного нуклеотида в последовательности ДНК (single nucleotide variation — SNV) [17]. Полиморфный вариант гена $IFNAR1$ рецептора $IFN\alpha$ проявляется в замене аллеля G на C в позиции 34715699 хромосомы 21 (rs2257167), что приводит к замене валина на лейцин при синтезе молекулы белка-рецептора. При полиморфном варианте гена $IFNAR2$ рецептора $IFN\alpha$ происходит замена аллеля T на C в позиции 34614250 хромосомы 21 (rs2229207), что приводит к замене фенилаланина на серин в белковой молекуле. Описан также полиморфизм в промоторной области гена $IFNGR1$ рецептора $IFN\gamma$, представляющий собой замену аллеля C на T в позиции 137541075 хромосомы 6 (rs1327474), которая может приводить к снижению экспрессии рецепторов и не влияет на их структуру.

Полиморфизм генов интерфероновых рецепторов имеет прогностическое значение и может объяснить врожденную восприимчивость или толерантность к инфекционным заболеваниям, в том числе вирусу SARS-CoV-2 [10, 12, 22, 26]. Изменение структуры белка рецептора вследствие однонуклеотидного полиморфизма может снижать чувствительность клеток к интерферонам, создавая более благоприятную среду для репликации вируса, что приводит к большей вероятности инфицирования, увеличению инфицирующей дозы, тяжести

заболевания и вероятности неблагоприятного исхода [27]. Лица с генетической предрасположенностью к рецидивирующим и/или тяжелым инфекциям чаще требуют назначения антибиотикотерапии, что является одним из факторов, влияющих на количественный и качественный состав кишечного микробиома и резистома [9].

Цель: оценить взаимосвязи между полиморфными вариантами генов интерфероновых рецепторов, тяжестью течения COVID-19 и распространенностью генов антибиотикорезистентности в микробиоте кишечника.

Материалы и методы

Участники исследования. Для участия в исследовании была сформирована выборка жителей Архангельска в возрасте от 42 до 76 лет ($n = 305$), отобранных случайным образом из числа участников популяционного исследования сердечно-сосудистых заболеваний «Узнай свое сердце» ($n = 2380$), проведенного на базе ФГБОУ ВО Северный государственный медицинский университет (Архангельск) Минздрава России (СГМУ) в 2015–2017 гг., наблюдаемых проспективно на предмет постановки клинических диагнозов и смертности от всех причин. Все участники предоставили добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Проведение всех этапов исследования было одобрено этическим комитетом СГМУ (протокол № 01/02-21 от 17.02.2021, протокол № 07/09-2022 от 28.09.2022, протокол № 06/09-23 от 27.09.23).

Процедура исследования и сбор данных о COVID-19. Процедура исследования включала сбор данных о факте заболевания и тяжести COVID-19, взятие крови для серологических и иммуногенетических исследований, а также сбор образцов кала для выявления генов антибиотикорезистентности.

Сбор данных о перенесенной участниками COVID-19 осуществлялся в течение двух периодов: I период — с 17 марта 2020 г. (дата выявления первого случая COVID-19 в Архангельске) до 30 июня 2021 г. (далее в тексте упоминается, как первые 12–15 месяцев пандемии) соответствует периоду циркуляции Уханьского штамма SARS-CoV-2; II период — с 1 июля 2021 г. по 10 ноября 2022 г., совпадает по времени с циркуляцией штаммов Дельта и Омикрон [1]. Информация о перенесенном COVID-19, включающая данные о тяжести заболевания, наличии пневмонии, факте госпитализации, собиралась по данным Федерального регистра переболевших COVID-19, на основании предоставленного участниками информированного согласия на доступ к медицинским данным. Сведения о вакцинации против SARS-CoV-2

получены из Федерального регистра вакцинированных от COVID-19.

Сбор биообразцов. Забор крови для оценки серологического статуса участников проводился двукратно: в период с 24 февраля по 30 июня 2021 г. (через 12–15 месяцев от начала пандемии), и в период с 3 октября по 10 ноября 2022 г. (окончание периода наблюдения) в клинично-диагностической лаборатории СГМУ. Забор крови проводили натошак. Вакутэйнеры с кровью центрифугировали для отделения сыворотки, затем аликвотировали в стрипованные пробирки. Образцы сыворотки, предназначенные для серологических исследований, и образцы цельной крови для иммуногенетических исследований замораживали и хранили при -80°C .

Образцы кала для изучения антибиотикорезистентности собирались однократно с 3 октября по 10 ноября 2022 г. после получения участниками подробного инструктажа по технике сбора и в течение суток доставлялись в лабораторию СГМУ, где они помещались в криопробирки, замораживались и хранились при температуре -80°C .

Серологическое исследование на антитела к SARS-CoV-2 и интерпретация их результатов. Образцы сыворотки крови участников, собранные в 2021 г., были исследованы с использованием набора реагентов для полуколичественного определения IgG к спайк (S)-белку SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа (Вектор-Бест, Россия). Положительный результат серологического исследования у участников, не имеющих сведений о перенесенном заболевании в Федеральном регистре переболевших COVID-19, рассматривался как бессимптомная инфекция. Поскольку исследование антител только к S-белку не позволяло дифференцировать участников на переболевших и вакцинированных против COVID-19, участники, получившие хотя бы одну дозу вакцины по данным Федерального регистра вакцинированных от COVID-19, были отнесены к категории не болевших COVID-19.

Образцы сыворотки, полученные в 2022 г., исследовались на наличие IgG к рецептор-связывающему домену (receptor-binding domain — RBD) и S2-субъединице S-белка и нуклеокапсидному (N)-белку SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа (Литех, Россия). Выявление серологических маркеров перенесенной COVID-19 (антитела к S2-, N-белку) у лиц, не болевших COVID-19 по данным Федерального регистра, расценивалось как бессимптомное инфицирование.

Исследование полиморфизма генов интерфероновых рецепторов. Для изучения полиморфизма генов интерфероновых рецепторов образцы цельной крови участников были транспорти-

рованы на сухом льду в лабораторию ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Москва) с соблюдением температурного режима на уровне не выше -50°C .

Исследование известных полиморфных вариантов генов рецепторов IFN α (rs2257167 и rs2229207) и IFN γ (rs1327474) проводилось методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе «DTprime 5» (ДНК-Технология, Россия). По результатам исследования полиморфного варианта гена *IFNAR1* (rs2257167) участники были разделены на группы по наличию аллелей G и C и по генотипам: GG, GC, CC. По полиморфному варианту гена *IFNAR2* (rs2229207) были сформированы группы по наличию аллелей T и C и по генотипам: TT, TC, CC. Поскольку гены *IFNAR1* и *IFNAR2* локализованы в одной хромосоме не исключается возможность сцепленного наследования возникающих в них мутаций. С учетом этого участники исследования были разделены по гаплотипам: GGTT, GCTT, CCTT, GGTC, GCTC, CCTC, GGCC, GCCC, CCCC. По результатам исследования полиморфного гена *IFNGR1* (rs1327474) сформированы группы по наличию аллелей T и C и по генотипам: TT, CT, CC.

Исследование антибиотикорезистентности. Для изучения генов антибиотикорезистентности замороженные образцы кала транспортировали в ФБУН НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора (Москва) в криоконтейнерах на сухом льду, с поддержанием температурного режима на уровне не выше -50°C .

Выделение ДНК проводили с использованием набора «НК-магнит» (Литех, Россия) на автоматической выделительной станции «KingFisher Flex» (Thermo Fisher Scientific, США). Для определения концентрации ДНК использовался спектрофотометр «UV-Vis NanoDrop» (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы исследовались на наличие генов резистентности к макролидам: Erythromycin ribosomal methylation gene (*ermB*), Macrolide efflux gene (*mefA*); бета-лактамам антибиотикам, включая гены, кодирующие Cefotaxime-beta-lactamase (*bla*_{CTX-M}), Dhahran beta-lactamase (*bla*_{DHA}), Oxacillinase 10 (*bla*_{OXA-10}), Oxacillinase 23 (*bla*_{OXA-23}), New Delhi metallo-beta-lactamase (*bla*_{NDM}); гликопептидам (*vanA* и *vanB*). Исследование генов антибиотикорезистентности в образцах кала проводилось методом ПЦР в режиме реального времени с применением набора реагентов «Резистом комплекс ESKAPE-V» (Литех, Россия) на амплификаторе «CFX96 Touch» (Bio-Rad Laboratories, США) [4].

Статистический анализ данных. Количественные данные, имеющие непараметрическое распределение, представлены в виде медианы. Качественные характеристики приведены в виде процентных долей. Сравнения каче-

ственных характеристик участников, разделенных на группы по наличию/отсутствию аллелей генов интерфероновых рецепторов, генотипам, гаплотипам, тяжести перенесенной COVID-19 и наличию генов резистентности к антибиотикам, проведены с использованием теста Хи-квадрат Пирсона или точного критерия Фишера. Статистический анализ данных проведен с помощью пакета статистических программ SPSS v.23 (IBM).

Результаты

Возраст участников исследования варьировал от 42 до 76 лет, медиана возраста составила 60 лет, 63,0% — женщины. Частота встречаемости аллеля С варианта rs2257167 гена *IFNAR1* (rs2257167) в исследуемой группе составила 0,135, аллель С варианта rs2229207 гена *IFNAR2* встречался с частотой 0,167, распространенность аллеля С вариант rs1327474 гена *IFNGR1* составила 0,325. В выборке преобладали гомозиготы по аллелю G варианта rs2257167 гена *IFNAR1*, гомозиготы по аллелю Т варианта rs2229207 гена *IFNAR2* и гетерозиготы СТ варианта rs1327474 гена *IFNGR1* (рис. 1).

По данным Федерального регистра переболевших COVID-19 манифестную (симптоматическую) форму COVID-19 в течение 12–15 месяцев пандемии (период циркуляции Уханьского штамма SARS-CoV-2) перенесли 17,4% (n = 53/305) участников исследования (рис. 2).

У трети участников (32,8%, 100/305), не получивших вакцинацию в течение первых 12–15 месяцев, не внесенных в регистр переболевших и не сообщивших при опросе о симптомах COVID-19, были обнаружены антитела

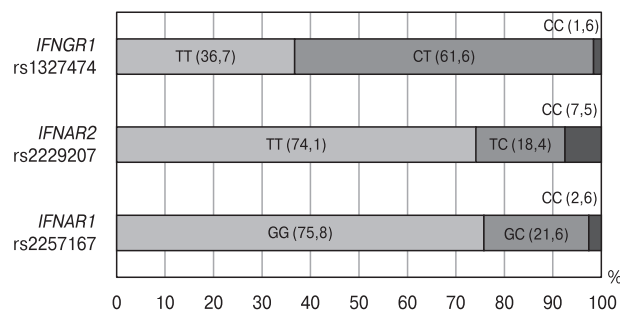


Рисунок 1. Генотипы участников по полиморфным вариантам генов интерфероновых рецепторов

Figure 1. Genotypes of participants based on polymorphic variants of interferon receptor genes

к S-белку SARS-CoV-2, что было расценено как бессимптомная форма COVID-19. Носители гомозигот по аллелю С варианта rs2257167 гена *IFNAR1* (генотип CC) чаще болели COVID-19 с симптомами в течение первых 12–15 месяцев от начала пандемии (83,3%, 5/6) в сравнении с генотипами GG+GC (32,7%, 48/147) (табл. 1). У участников, имеющих аллель Т варианта rs2229207 гена *IFNAR2*, COVID-19 также чаще протекала манифестно (37,3%, 93/249) в сравнении с не имеющими аллеля Т (22,8%, 13/57). Соответственно, одновременное присутствие аллеля С варианта rs2257167 гена *IFNAR1* и аллеля Т варианта rs2229207 гена *IFNAR2* у лиц с гаплотипом CCTT было ассоциировано с манифестным течением инфекции.

В течение второго периода наблюдения (период циркуляции штамма Дельта и Омикрон) еще 68 участников переболели манифестной формой COVID-19. Из них 42 (61,8%) человека ранее не встречались с SARS-CoV-2,

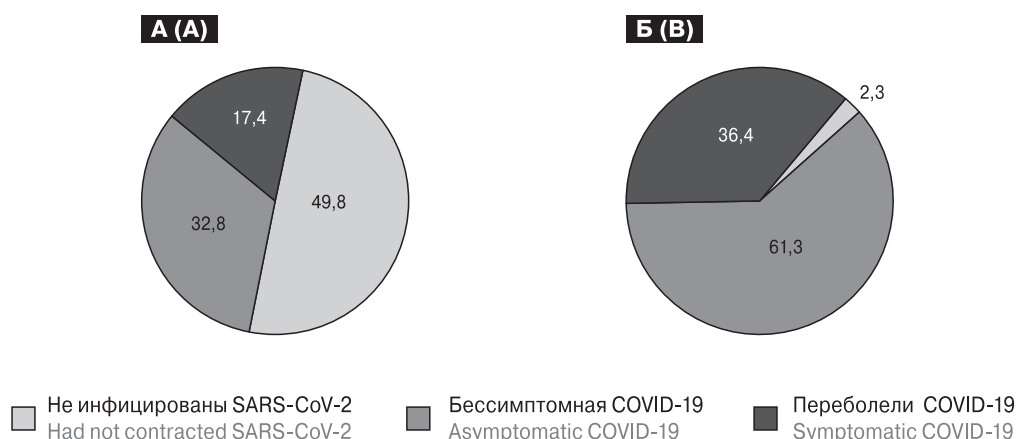


Рисунок 2. Доли участников, переболевших COVID-19 с симптомами и без симптомов в течение 12–15 месяцев от начала пандемии (А) и в течение 2,5 лет от начала пандемии (Б)

Figure 2. Percentage of COVID-19 participants with and without symptoms 12–15 months (A) and 2.5 years after the onset of the pandemic (B)

Примечание. На рис. 2А — вакцинированные против SARS-CoV-2 отнесены к категории не болевших COVID-19.
Note. On Fig. 2A — vaccinated subjects against SARS-CoV-2 are classified as not contracted COVID-19.

16 (23,5%) человек ранее перенесли COVID-19 бессимптомно и 10 (14,7%) человек переболели COVID-19 с симптомами повторно. Манифестное течение COVID-19 в течение данного периода наблюдения чаще отмечалось у лиц с гаплотипом GCTT, имевших аллель С варианта rs2257167 гена *IFNAR1* и аллель Т варианта rs2229207 гена *IFNAR2*. Эти же генетические детерминанты были ассоциированы с манифестным течением инфекции при инфицировании в течение первых 12–15 месяцев пандемии. Серологические маркеры перенесенной инфекции (IgG к S2-, N-белкам SARS-CoV-2) в течение второго периода появились у 103 участников, ранее серонегативных к SARS-CoV-2. Поскольку симптомов COVID-19 у этих участников не отмечалось, появление антител к белкам вируса было расценено как бессимптомное инфицирование.

Таким образом, к октябрю-ноябрю 2022 г. доля участников, манифестно переболевших COVID-19, увеличилась до 36,4% (n = 111) (рис. 2). Доля участников, не болевших COVID-19, но имевших серологические маркеры перенесенной инфекции составила 61,3% (n = 187). Семь из 305 участников (2,3%) не болели COVID-19 и оставались серонегативными к SARS-CoV-2 в течение всего периода наблюдения.

По данным регистра большинство участников, манифестно переболевших COVID-19 за весь период наблюдения, перенесли заболевание в легкой форме, у 6,3% (7/111) наблюдалась среднетяжелая форма заболевания. Тяжелых форм COVID-19 среди участников исследования не было. Большинство участников лечились амбулаторно, госпитализировано — 18,0% (20/111). Пневмония диагностирована у 27,9% (31/111) переболевших COVID-19. У лиц, имеющих гетерозиготные генотипы одновременно по варианту rs2257167 гена *IFNAR1* и варианту rs2229207 *IFNAR2* (гаплотип GCTC), COVID-19 чаще протекала с пневмонией, им чаще требовалась госпитализация (табл. 2).

К концу периода наблюдения (ноябрь 2022 г.) гены резистентности к антибиотикам были обнаружены в составе резистома микробиоты кишечника у 98,4% (300/305) участников. У 4,9% (15/305) обследованных выявлены гены резистентности к трем разным классам антибиотиков. Резистентность к трем классам антибактериальных препаратов с большей частотой наблюдалась у лиц с гаплотипом CCTT в сравнении с другими гаплотипами (табл. 3).

Гены резистентности к макролидам выявлены практически у всех участников (98,4%). Резистентность к макролидам (ген *ermB*) реже наблюдалась у участников, имеющих аллель Т и генотип TT варианта rs2229207 гена *IFNAR2*

Таблица 1. Взаимосвязь между полиморфными вариантами генов интерфероновых рецепторов и восприимчивостью к SARS-CoV-2/ манифестностью COVID-19 в течение первых 12–15 месяцев пандемии, n = 305

Table 1. The associations between polymorphic variants of interferon receptor genes and susceptibility to SARS-CoV-2/manifestation of COVID-19 during the first 12–15 months of the pandemic; n = 305

Полиморфный вариант Polymorphic variant	12–15 месяцев от начала пандемии COVID-19 12–15 months from the onset of COVID-19 pandemic				Весь период наблюдения Entire observation period						
	Инфицированы SARS-CoV-2 Infected with SARS-CoV-2		Не болели COVID-19 ³ Participants who had not contracted COVID-19 ³		Инфицированы SARS-CoV-2 Infected with SARS-CoV-2		Не болели COVID-19 ³ Subjects not contracted COVID-19 ³				
	Симптоматическая форма COVID-19 ¹ Symptomatic COVID-19 ¹	Бессимптомная форма COVID-19 ² Asymptomatic COVID-19 ²	Симптоматическая форма COVID-19 ¹ Symptomatic COVID-19 ¹	Бессимптомная форма COVID-19 ² Asymptomatic COVID-19 ²	Симптоматическая форма COVID-19 ¹ Symptomatic COVID-19 ¹	Бессимптомная форма COVID-19 ² Asymptomatic COVID-19 ²	Симптоматическая форма COVID-19 ¹ Symptomatic COVID-19 ¹	Бессимптомная форма COVID-19 ² Asymptomatic COVID-19 ²			
	N (%) ⁴	N (%) ⁴	N (%) ⁴	N (%) ⁴	N (%) ⁴	N (%) ⁴	N (%) ⁵	p**			
G	85 (32,5)	176 (67,5)	0,066	267 (50,6)	0,359	185 (35,0)	331 (65,0)	0,073	12 (2,3)	0,925	528 (100)
C	21 (46,7)	24 (53,3)		37 (45,1)		37 (46,2)	43 (53,8)		2 (2,4)		82 (100)
GG	37 (32,5)	77 (67,5)	0,332	117 (50,6)	0,616	79 (35,0)	147 (65,0)	0,147	5 (2,2)	0,538	231 (100)
GC+CC	16 (41,0)	23 (59,0)		35 (47,3)		32 (44,4)	40 (55,6)		2 (2,7)		74 (100)
CC	5 (83,3)	1 (16,7)	0,019	2 (25,0)	0,143	5 (62,5)	3 (37,5)	0,131	0 (0,0)	0,829	8 (100)
GG+GC	48 (32,7)	99 (67,5)		150 (50,5)		106 (36,6)	184 (63,4)		7 (2,4)		297 (100)
<i>IFNAR1</i> — rs2257167											

(табл. 3). В сравнении с другими гаплотипами ген *ermB* чаще обнаруживался у лиц с гаплотипом GGTC и реже — у участников с гаплотипом GCTT.

Четверть участников (26,9%, 82/305) имели в составе резистоста микробиоты кишечника гены бета-лактамаз. Гены *bla*_{CTX-M}, кодирующие бета-лактамазы широкого спектра действия, способные гидролизовать пенициллины, большинство цефалоспоринов и монобактамы, с большей частотой выявлялись у лиц с гаплотипом GGTC, чаще болевших COVID-19 с пневмонией и получавших стационарное лечение (табл. 2, 3). Ген *bla*_{DHA}, кодирующий Amp-C

бета-лактамазу с повышенной активностью к цефалоспорином по сравнению с пенициллинами и мало чувствительную к ингибиторам бета-лактамаз, и ген *bla*_{OXA-23}, ассоциированный с устойчивостью к карбапенемам, пенициллинам, цефалоспорином узкого спектра действия, реже выявлялись среди участников, имеющих аллель T варианта rs2229207 гена *IFNAR2*.

Гены резистентности к гликопептидам были выявлены у 13,8% (42/305) и чаще встречались в резистоме участников с генотипом CC варианта rs2257167 гена *IFNAR1*, чаще других манифестно болевших COVID-19 в течение первого года пандемии (табл. 3).

Таблица 2. Взаимосвязь между полиморфными вариантами генов интерфероновых рецепторов и тяжестью COVID-19 у лиц с манифестным течением заболевания, n = 111

Table 2. The associations between polymorphic variants of interferon receptor genes and COVID-19 severity in individuals with symptomatic infection, n = 111

Полиморфный вариант Polymorphic variant	Пневмония при COVID-19* COVID-19 with pneumonia* N (%)	p**	Госпитализация с COVID-19* Hospitalization with COVID-19* N (%)	p*	Всего Total
IFNAR1 — rs2257167					
G	49 (26,5)	0,284	30 (16,2)	0,118	185 (100)
C	13 (35,1)		10 (27,0)		37 (100)
GG	21 (26,6)	0,620	11 (13,9)	0,078	79 (100)
GC+CC	10 (31,3)		9 (28,1)		32 (100)
CC	3 (60,0)	0,132	1 (20,0)	0,637	5 (100)
GG+GC	28 (26,4)		19 (17,9)		106 (100)
IFNAR2 — rs2229207					
T	50 (26,0)	0,113	32 (16,7)	0,185	192 (100)
C	12 (40,0)		8 (26,7)		30 (100)
TT	21 (24,1)	0,090	13 (14,9)	0,108	87 (100)
TC+CC	10 (41,7)		7 (29,2)		24 (100)
CC	2 (33,3)	0,538	1 (16,7)	0,705	6 (100)
TT+TC	29 (27,6)		19 (18,1)		105 (100)
IFNAR rs2257167 & rs2229207					
GGTT	16 (25,8)	0,363	8 (12,9)	0,115	62 (100)
GGTC	4 (30,8)	0,519	2 (15,4)	0,573	13 (100)
GGCC	1 (25,0)	0,689	1 (25,0)	0,554	4 (100)
GCTT	3 (14,3)	0,097	4 (19,0)	0,554	21 (100)
GCTC	4 (80,0)	0,021	4 (80,0)	0,004	5 (100)
GCCC	0 (0,0)	0,721	0 (0,0)	0,820	1 (100)
CCTT	2 (50,0)	0,311	1 (25,0)	0,554	4 (100)
CCTC	—	—	—	—	—
CCCC	1 (100)	0,279	0 (0,0)	0,820	1 (100)
IFNGR1 — rs1327474					
C	15 (21,1)	0,121	12 (16,9)	0,767	71 (100)
T	47 (31,1)		28 (18,5)		151 (100)
CC	0 (0,0)	0,518	1 (50,0)	0,329	2 (100)
CT+TT	31 (28,4)		19 (17,4)		109 (100)
TT	16 (38,1)	0,062	9 (21,4)	0,314	42 (100)
CC+CT	15 (21,7)		11 (15,9)		69 (100)
Всего/Total	31 (27,9)		20 (18,0)		111 (100)

Примечание. *По данным Федерального регистра переболевших COVID-19; **Хи-квадрат Пирсона/точный критерий Фишера.
Note. *According to the data from the Federal Register of COVID-19 patients; **Pearson Chi-square/Fisher's exact test.

Таблица 3. Взаимосвязь между полиморфными вариантами генов интерфероновых рецепторов и наличием генов резистентности к антибиотикам в составе резистоста микробиоты кишечника, n = 305

Table 3. The associations between polymorphic variants of interferon receptor genes and presence of antibiotic resistance genes in gut microbiota resistome, n = 305

Полиморфный вариант Polymorphic variant	Гены устойчивости к антибиотикам Antibiotic resistance genes											Всего Total
	Макролиды, N (%) Macrolides, N (%)		β-лактамы, N (%) β-lactams, N (%)			Гликопептиды, N (%) Glycopeptide, N (%)			Три класса антибиотиков, N (%) Three classes of antibiotics, N (%)			
	<i>mef</i>	<i>ermB</i>	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA-10}	<i>bla</i> _{OXA-10}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>			
IFNAR1 – rs2257167												
G	520 (98,5)	470 (89,0)	85 (16,0)	40 (7,6)	24 (4,5)	2 (0,4)	2 (0,4)	2 (0,4)	2 (0,4)	67 (12,7)	23 (4,4)	528 (100)
C	80 (97,6)	68 (82,9)	15 (18,3)	8 (9,8)	6 (7,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	15 (18,3)	7 (8,5)	82 (100)
GG	228 (98,7)	208 (90,0)	36 (15,6)	17 (7,4)	10 (4,3)	1 (0,4)	1 (0,4)	1 (0,4)	1 (0,4)	29 (12,6)	10 (4,3)	231 (100)
GC/CC	72 (97,3)	61 (82,4)	14 (18,9)	7 (9,5)	5 (6,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	12 (16,2)	5 (6,8)	74 (100)
CC	8 (100)	7 (87,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (37,5)*	2 (25,0)	8 (100)
GG+GC	292 (98,3)	262 (88,2)	49 (16,5)	23 (7,7)	14 (4,7)	1 (0,3)	1 (0,3)	1 (0,3)	1 (0,3)	38 (12,8)*	13 (4,4)	297 (100)
IFNAR2 – rs2229207												
T	498 (98,0)	439 (86,4)*	80 (15,7)	38 (7,5)	23 (4,5)*	0 (0,0)*	2 (0,4)	1 (0,2)	1 (0,2)	73 (14,4)	27 (5,3)	508 (100)
C	102 (100)	99 (97,1)*	20 (19,6)	10 (9,8)	10 (9,8)*	2 (2,0)*	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (1,0)	9 (8,8)	3 (2,9)	102 (100)
TT	221 (97,8)	192 (85,0)*	33 (14,6)	17 (7,5)	10 (4,4)	0 (0,0)	1 (0,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	33 (14,6)	12 (5,3)	226 (100)
TC+CC	79 (100)	77 (97,5)*	17 (21,5)	7 (8,4)	5 (6,3)	1 (1,3)	0 (0,0)	1 (1,3)	1 (1,3)	8 (10,1)	3 (3,8)	79 (100)
CC	23 (100)	22 (95,7)	3 (13,0)	3 (13,0)	2 (8,7)	1 (4,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,3)	0 (0,0)	23 (100)
TT+TC	277 (98,2)	247 (87,6)	47 (16,7)	21 (7,4)	13 (4,6)	0 (0,0)	1 (0,4)	1 (0,4)	1 (0,4)	40 (14,2)	15 (5,3)	282 (100)
IFNAR rs2257167 & rs2229207												
GGTT	170 (98,3)	152 (87,9)	28 (16,2)	12 (6,9)	5 (2,9)	0 (0,0)	1 (0,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	24 (13,9)	1 (2,2)	173 (100)
GGTC	40 (100)	39 (97,5)*	6 (15,0)	2 (5,0)	3 (7,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,5)	1 (2,5)	4 (10,0)	1 (2,5)	40 (100)
GGCC	18 (100)	17 (94,4)	2 (11,1)	3 (16,7)	2 (11,1)	1 (5,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,6)	0 (0,0)	18 (100)
GCTT	44 (96,7)	34 (73,9)*	5 (10,9)	4 (8,7)	4 (8,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (13,0)	2 (1,5)	46 (100)
GCTC	16 (100)	16 (100)	8 (50,0)*	2 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (18,8)	2 (12,5)	16 (100)
GCCC	4 (100)	4 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (100)
CCTT	7 (100)	6 (85,7)	0 (0,0)	1 (14,3)	1 (14,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (42,9)	2 (28,6)*	7 (100)
CCTC	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
CCCC	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100)
IFNGR1 – rs1327474												
C	197 (99,5)	174 (87,8)	27 (13,6)	15 (7,6)	7 (3,5)	1 (0,5)	0 (0,0)	1 (0,5)	1 (0,5)	24 (12,1)	5 (2,5)	198 (100)
T	403 (97,8)	364 (88,3)	73 (17,7)	33 (8,0)	23 (5,6)	1 (0,2)	2 (0,5)	1 (0,2)	1 (0,2)	58 (14,1)	25 (6,1)	412 (100)
CC	5 (100)	4 (80,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	5 (100)
CT+TT	295 (98,3)	265 (88,3)	50 (16,7)	24 (8,0)	15 (5,0)	1 (0,3)	1 (0,3)	1 (0,3)	1 (0,3)	40 (13,3)	15 (5,0)	300 (100)
TT	108 (96,4)	99 (88,4)	23 (20,5)	9 (8,0)	8 (7,1)	0 (0,0)	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	18 (16,1)	10 (8,9)*	112 (100)
CC+CT	192 (99,5)	170 (88,1)	27 (14,0)	15 (7,8)	7 (3,6)	1 (0,5)	0 (0,0)	1 (0,5)	1 (0,5)	23 (11,9)	5 (2,6)*	193 (100)
Всего/Total	300	269	50	24	15	1	1	1	1	41	15	305 (100)

Примечание. *Хи-квадрат Пирсона/точный критерий Фишера, p < 0,05.

Note. *Pearson chi-square/Fisher exact test, p < 0.05.

Обсуждение

В течение первых 12–15 месяцев пандемии 17,4% участников исследования перенесли COVID-19 с симптомами, 32,8% болели бессимптомно. К осени 2022 г. доля участников, перенесших COVID-19 с симптомами или бессимптомно, увеличилась вдвое.

Частота встречаемости аллеля С варианта rs2257167 гена *IFNAR1* в исследуемой группе (0,135) была сопоставима с распространенностью данного аллеля среди жителей Европы (0,137) [7]. Частота аллеля С варианта rs2229207 гена *IFNAR2* составила 0,167, в то время как частота данного аллеля в западно-европейских странах, по данным базы ALFRED, колеблется от 0,040 до 0,220. Обращает внимание, что в российских популяциях доля аллеля С больше (0,220), чем в других европейских популяциях, где максимальная распространенность — 0,150. Для объяснения причин того, почему именно в российских популяциях сохранился этот аллель, а в европейских популяциях элиминировал, требуется проведение отдельного исследования с анализом разных популяций. Следует заметить, что в азиатских популяциях данный аллель встречается значительно чаще — от 0,040 до 0,340. Распространенность аллеля С варианта rs1327474 гена *IFNGR1* среди участников исследования (0,325) была несколько ниже, чем в европейских популяциях, где частота встречаемости данного аллеля варьировала от 0,411 до 0,710. По данным базы ALFRED в российских популяциях распространенность данного аллеля также была несколько выше (0,480–0,658), чем в нашей выборке.

Обладатели самого редкого в выборке генотипа СС варианта rs2257167 гена *IFNAR1* чаще болели COVID-19 манифестно в начале пандемии. У данной категории участников (генотип СС, rs2257167, *IFNAR1*), у лиц с генотипом ТТ варианта rs2229207 гена *IFNAR2* и гаплотипами ССТТ и GCTT чаще наблюдались манифестные формы заболевания. Генотип GCTC был ассоциирован с наличием пневмонии при COVID-19 и госпитализацией в стационар.

Ранее проведенные исследования показали, что полиморфизмы в структуре гена *IFNAR2* могут приводить к изменению конформации белка-рецептора, снижая чувствительность клеток к интерферонам I типа и тем самым увеличивая восприимчивость и тяжесть COVID-19, что подтверждается нашими данными [21]. Тяжесть COVID-19 тесно связана с подавлением и дисрегуляцией интерфероновой ответа [15]. Интерфероны I типа играют критическую роль в патогенезе COVID-19 [8]. Сигнальный путь, запускаемый интерферонами I типа, играет решающую роль не только в противовирусной за-

щите на ранних стадиях заболевания, но и в регуляции активации моноцитов и ограничении чрезмерной миграции нейтрофилов в очаг воспаления на фоне COVID-19 [28]. В целом полагают, что генетические и негенетические показатели дефицита в системе интерферона могут быть маркерами 15% жизнеугрожающих случаев COVID-19 [23].

Редкие полиморфные варианты генов системы интерферона человека, участвующих в распознавании вирусных инфекций, стимуляции выработки интерферона и передачи противовирусных сигналов, в том числе *IFNAR2*, были связаны с развитием тяжелого течения COVID-19 [23]. Однако опубликованных результатов исследований взаимосвязи COVID-19 с полиморфными вариантами *IFNAR1* (rs2257167) и *IFNGR1* (rs1327474) не найдено.

Среди участников исследования выявлена высокая распространенность генов резистентности к макролидам, что может быть обусловлено широким применением данного класса антибиотиков в период пандемии COVID-19. В течение первого года пандемии азитромицин назначался в качестве препарата для этиотропного лечения COVID-19, и только с февраля 2021 г. его применение было ограничено тяжелыми формами заболевания [2, 3]. Резистентность к макролидам по гену *ermB* реже наблюдалась у участников, болевших COVID-19 манифестно (аллель Т варианта rs2229207 гена *IFNAR2*). Важно отметить, что частота обнаружения гена *ermB* была ниже у лиц с генотипом ТТ варианта rs2229207 гена *IFNAR2*, которые несколько чаще болели COVID-19 манифестно в течение 12–15 месяцев пандемии (39,1%, 44/111) в сравнении с генотипами ТС+СС (23,3%, 10/43) (табл. 1), но частота пневмонии при COVID-19 среди них была более низкой (24,1%, 21/87) в сравнении с другими генотипами данного варианта гена *IFNAR2* (41,7%, 10/24) (табл. 2). Однако уровень статистической значимости в частоте манифестных форм и пневмонии для данного генотипа (генотип ТТ варианта rs2229207 гена *IFNAR2*) превышает уровень 0,05. Ген *ermB* также реже выявлялся у лиц гаплотипом GCTT, переболевших манифестно в период после 2021 г., когда азитромицин перестал использоваться в качестве этиотропной терапии на амбулаторном этапе.

Резистентность к нескольким классам антибиотиков чаще выявлялась среди лиц с гаплотипом ССТТ, ассоциированным с большей частотой манифестных форм, и участников, имеющих генотип ТТ варианта rs1327474 гена *IFNGR1*. Более частое выявление пневмонии при COVID-19 среди участников с генотипом ТТ данного полиморфного варианта (38,1%, 16/42) в сравнении с генотипами СС+СТ (21,7%, 15/69) вероятно было сопряжено с более высокой частотой назна-

чения антибактериальных препаратов данной группе пациентов, однако различия в частоте пневмонии не достигают уровня статистической значимости. Результаты исследований, проведенных другими авторами, показывают большее количество и разнообразие генов антибиотикорезистентности у реконвалесцентов COVID-19, получавших антибактериальную терапию [13]. Гены резистентности к бета-лактамам антибиотикам чаще выявлялись у лиц, переболевших COVID-19 с пневмонией и чаще получавших стационарное лечение (гаплотип GCTC), что также согласуется с результатами, опубликованными другими исследователями [13].

В статье представлены результаты первого в России исследования взаимосвязей однонуклеотидных вариантов генов интерфероновых рецепторов с восприимчивостью к COVID-19 и носительством генов антибиотикорезистентности. Следует отметить, что в рамках протокола данного исследования изучались лишь несколько полиморфных вариантов генов интерферонового звена иммунитета, а также гены резистентности к антибиотикам, наиболее часто применяемым в клинической практике. Помимо этого, представленные результаты следует интерпретировать с учетом ограничений данного исследования. Поскольку для участия в исследовании были отобраны взрослые в возрасте от 42 до 76 лет, полученные результаты не могут быть экстраполированы на всю популяцию жителей Архангельска. Сведения о перенесенной COVID-19 собирались из Федерального регистра лиц, переболевших COVID-19, и зависят от полноты и качества внесенных в него данных.

Сбор образцов для первого серологического обследования (через 12–15 месяцев от начала пандемии) проводился в течение четырех месяцев, с 24 февраля по 30 июня 2021 г., в рамках третьего эпидемиологического популяционного исследования по выявлению факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний в регионах Российской Федерации (ЭССЕ-РФ3). В этот период количество случаев COVID-19 в Архангельске было относительно низким и варьировало от 51 до 149 случаев на 1 082 622 населения, но тем не менее отбор образцов в течение продолжительного периода времени мог привести к недооценке распространенности инфекции.

Генетические детерминанты восприимчивости к инфекции проявили себя в первые 12–15 месяцев пандемии, когда распространен-

ность вакцинации против SARS-CoV-2 среди участников исследования была относительно низкой (9,8%, 30/305). При оценке взаимосвязей между изучаемыми полиморфными вариантами и манифестностью COVID-19 в течение 12–15 месяцев пандемии вакцинированные участники ($n = 30$) были отнесены к группе не болевших COVID-19. Ввиду высокой распространенности среди участников исследования серологических маркеров перенесенной инфекции (97,7%, 298/305, имели IgG к S2- и N-белкам SARS-CoV-2) при оценке изучаемых взаимосвязей за весь период наблюдения вакцинальный статус не учитывался, а разделение участников на группы проводилось на основании данных регистра переболевших COVID-19 с учетом результатов серологического исследования. Следует отметить, что точность определения серологического статуса к COVID-19 зависела от характеристик (чувствительность/специфичность) используемых тест-систем, что могло отразиться на полученных результатах. Кроме того, использование моновариантного анализа для изучения взаимосвязей полиморфных вариантов генов интерфероновых рецепторов с восприимчивостью, тяжестью COVID-19 и носительству генов антибиотикорезистентности, не позволяло исключить влияния потенциальных конфаундеров (вмешивающихся факторов).

В исследуемой группе не было участников, перенесших COVID-19 в тяжелой форме, следовательно, требуются дальнейшие исследования для изучения взаимосвязей однонуклеотидных вариантов генов интерфероновых рецепторов с тяжелыми формами инфекции.

Заключение

Выявлены генетические детерминанты восприимчивости и манифестного течения (генотип CC варианта rs2257167 гена *IFNAR1*, аллель T варианта rs2229207 гена *IFNAR2*, гаплотип CCTT) и тяжести COVID-19 (гаплотип GCTC).

Взаимосвязь полиморфизма генов, ответственных за иммунный ответ, и тяжести течения COVID-19 может использоваться для выявления людей с генетической предрасположенностью к тяжелому течению инфекции и определения приоритетных групп для проведения вакцинации, в том числе для профилактики антибиотикорезистентности при осложненном течении вирусных инфекций.

Список литературы/References

1. Гушин В.А., Почтовый А.А., Кустова Д.Д., Огаркова Д.А., Клейменов Д.А., Семененко Т.А., Логунов Д.Ю., Злобин В.И., Гинцбург А.Л. Характеристика эпидемического процесса COVID-19 в Москве и поиск возможных факторов, определяющих тенденции наблюдаемых изменений // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2023. Т. 100, № 4. С. 267–284. [Gushchin V.A., Pochtovyi A.A., Kustova D.D., Ogarkova D.A., Kleymenov D.A., Semenenko T.A., Logunov D.Y., Zlobin V.I., Gintsburg A.L. Characterisation of the COVID-19 epidemic process in Moscow and search for possible

- determinants of the trends of the observed changes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2023, vol. 100, no. 4, pp. 267–284. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-375
2. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 9 (26.10.2020). Минздрав РФ, 2020. 236 с. [Interim guidelines. Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19). Version 9 (26.10.2020). Ministry of Health of the Russian Federation, 2020. 236 p. (In Russ.)] URL: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/052/548/original/%D0%9C%D0%A0_COVID-19_%28v.9%29.pdf
 3. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 10 (08.02.2021). Минздрав РФ, 2021. 261 с. [Interim guidelines. Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19). Version 10 (08.02.2021). Ministry of Health of the Russian Federation, 2021. 261 p. (In Russ.)] URL: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/054/588/original/%D0%92%D1%80%D0%B5%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D0%9C%D0%A0_COVID-19_%28v.10%29-08.02.2021_%281%29.pdf
 4. Кригер Е.А., Павленко А.В., Есин Ю.П., Архипова А.Л., Ковальчук С.Н., Шагров Л.Л., Белова Н.И., Цыварева Н.П., Кудрявцев А.В., Ильина Е.Н. Распространенность генов устойчивости к антибиотикам в составе резистома взрослых жителей Архангельска с учетом тяжести перенесенной COVID-19 // Журнал инфектологии. 2023. Т. 15, № 3. С. 92–109. [Krieger E.A., Pavlenko A.V., Esin Yu.P., Arkhipova A.L., Kovalchuk S.N., Shagrov L.L., Belova N.I., Tsyvareva N.P., Kudryavtsev A.V., Ilina E.N. Prevalence of antibiotic resistance genes in resistome of adult residents of Arkhangelsk with regard to the severity of COVID-19. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2023, vol. 15, no. 3, pp. 92–109. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2023-15-3-92-109
 5. Луцкий А.А., Жирков А.А., Лобзин Д.Ю., Рао М., Алексеева Л.А., Мейпер М., Лобзин Ю.В. Интерферон-γ: биологическая функция и значение для диагностики клеточного иммунного ответа // Журнал инфектологии. 2015. Т. 7, № 4. С. 10–22. [Lutckii A.A., Zhirkov A.A., Lobzin D.Yu., Rao M., Alekseeva L.A., Maeurer M., Lobzin Yu.V. Interferon-γ: biological function and application for study of cellular immune response. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 10–22. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2015-7-4-10-22
 6. Шишиморов И.Н., Магницкая О.В., Пономарева Ю.В. Генетические предикторы тяжести течения и эффективности фармакотерапии COVID-19 // Фармация и фармакология. 2021. Т. 9, № 3. С. 174–184. [Shishimorov I.N., Magnitskaya O.V., Ponomareva Yu.V. Genetic predictors of severity and efficacy of COVID-19 pharmacotherapy. *Farmatsiya i farmakologiya = Pharmacy & Pharmacology*, 2021, vol. 9, no. 3, pp. 174–184. (In Russ.)] doi: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-174-184]
 7. The Allele Frequency Net Database. URL: <http://allelefrequenciest.net> (14.10.2023)
 8. Channappanavar R., Fehr A.R., Zheng J., Wohlford-Lenane C., Abrahante J.E., Mack M., Sompallae R., McCray P.B. Jr., Meyerholz D.K., Perlman S. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J. Clin. Invest.*, 2019, vol. 129, no. 9, pp. 3625–3639. doi: 10.1172/JCI126363
 9. Crits-Christoph A., Hallowell H.A., Koutouvalis K., Suez J. Good microbes, bad genes? The dissemination of antimicrobial resistance in the human microbiome. *Gut Microbes.*, 2022, vol. 14, no. 1: 2055944. doi: 10.1080/19490976.2022.2055944
 10. Fricke-Galindo I., Martínez-Morales A., Chávez-Galán L., Ocaña-Guzmán R., Buendía-Roldán I., Pérez-Rubio G., Hernández-Zenteno R.J., Verónica-Aguilar A., Alarcón-Dionet A., Aguilar-Duran H., Gutiérrez-Pérez I.A., Zaragoza-García O., Alanis-Ponce J., Camarena A., Bautista-Becerril B., Nava-Quiroz K.J., Mejía M., Guzmán-Guzmán I.P., Falfán-Valencia R. IFNAR2 relevance in the clinical outcome of individuals with severe COVID-19. *Front. Immunol.*, 2022, vol. 13: 949413. doi: 10.3389/fimmu.2022.949413
 11. Fuchs S.Y. Hope and fear for interferon: the receptor-centric outlook on the future of interferon therapy. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2013, vol. 33, no. 4, pp. 211–225. doi: 10.1089/jir.2012.0117
 12. He S., Wang B., Zhu X., Chen Z., Chen J., Hua D., Droma D., Li W., Yuan D., Jin T. Association of IFNGR1 and IFNG genetic polymorphisms with the risk for pulmonary tuberculosis in the Chinese Tibetan population. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 58, pp. 98417–98425. doi: 10.18632/oncotarget.21413
 13. Kang Y., Chen S., Chen Y., Tian L., Wu Q., Zheng M., Li Z. Alterations of fecal antibiotic resistome in COVID-19 patients after empirical antibiotic exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 2022, vol. 240: 113882. doi: 10.1016/j.ijheh.2021.113882
 14. Karkhane M., Mohebbi S.R., Sharifian A., Ghaemi A., Asadzadeh Aghdai H., Zali M.R. A gene variation of Interferon Gamma Receptor-I promoter (rs1327474A>G) and chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterol. Hepatol. Bed. Bench*, 2019, vol. 12, no. 1, pp. 46–51.
 15. Kim N.E., Song Y.J. Coordinated regulation of interferon and inflammasome signaling pathways by SARS-CoV-2 proteins. *J. Microbiol.*, 2022, vol. 60, no. 3, pp. 300–307. doi: 10.1007/s12275-022-1502-8
 16. Marchetti M., Monier M.N., Fradagrada A., Mitchell K., Baychelier F., Eid P., Johannes L., Lamaze C. Stat-mediated signaling induced by type I and type II interferons (IFNs) is differentially controlled through lipid microdomain association and clathrin-dependent endocytosis of IFN receptors. *Mol. Biol. Cell*, 2006, vol. 17, no. 7, pp. 2896–2909. doi: 10.1091/mbc.e06-01-0076
 17. National Human Genome Research Institute. Polymorphism. URL: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymorphism> (14.10.2023)
 18. Platanias L.C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, vol. 5, no. 5, pp. 375–386. doi: 10.1038/nri1604
 19. Primorac D., Vrdoljak K., Brlek P., Pavelić E., Molnar V., Matišić V., Erceg Ivkošić I., Parčina M. Adaptive immune responses and immunity to SARS-CoV-2. *Front. Immunol.*, 2022, vol. 13: 848582. doi: 10.3389/fimmu.2022.848582
 20. Samuel C.E. Interferon at the crossroads of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease. *J. Biol. Chem.*, 2023, vol. 299, no. 8: 104960. doi: 10.1016/j.jbc.2023.104960
 21. Schmiedel B.J., Rocha J., Gonzalez-Colin C., Bhattacharyya S., Madrigal A., Ottensmeier C.H., Ay F., Chandra V., Vijayanand P. COVID-19 genetic risk variants are associated with expression of multiple genes in diverse immune cell types. *Nat. Commun.*, 2021, vol. 12, no. 1: 6760. doi: 10.1038/s41467-021-26888-3
 22. Song le H., Xuan N.T., Toan N.L., Binh V.Q., Boldt A.B., Kremsner P.G., Kun J.F. Association of two variants of the interferon-alpha receptor-1 gene with the presentation of hepatitis B virus infection. *Eur. Cytokine Netw.*, 2008, vol. 19, no. 4, pp. 204–210. doi: 10.1684/ecn.2008.0137
 23. Stertz S., Hale B.G. Interferon system deficiencies exacerbating severe pandemic virus infections. *Trends Microbiol.*, 2021, vol. 29, no. 11, pp. 973–982. doi: 10.1016/j.tim.2021.03.001

24. COVID-19 Host Genetics Initiative. The COVID-19 Host Genetics Initiative, a global initiative to elucidate the role of host genetic factors in susceptibility and severity of the SARS-CoV-2 virus pandemic. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2020, vol. 28, no. 6, pp. 715–718. doi: 10.1038/s41431-020-0636-6
25. Velavan T.P., Pallerla S.R., Rüter J., Augustin Y., Kreamsner P.G., Krishna S., Meyer C.G. Host genetic factors determining COVID-19 susceptibility and severity. *EBioMedicine*, 2021, vol. 72: 103629. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103629
26. Welzel T.M., Morgan T.R., Bonkovsky H.L., Naishadham D., Pfeiffer R.M., Wright E.C., Hutchinson A.A., Crenshaw A.T., Bashirova A., Carrington M., Dotrang M., Sterling R.K., Lindsay K.L., Fontana R.J., Lee W.M., Di Bisceglie A.M., Ghany M.G., Gretch D.R., Chanock S.J., Chung R.T., O'Brien T.R.; HALT-C Trial Group. Variants in interferon-alpha pathway genes and response to pegylated interferon-Alpha2a plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C virus infection in the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Hepatology*, 2009, vol. 49, no. 6, pp. 1847–1858. doi: 10.1002/hep.22877
27. Xia C., Wolf J.J., Sun C., Xu M., Studstill C.J., Chen J., Ngo H., Zhu H., Hahm B. PARP1 enhances influenza A virus propagation by facilitating degradation of host type I interferon receptor. *J. Virol.*, 2020, vol. 94, no. 7: e01572-19. doi: 10.1128/JVI.01572-19
28. Zhang Q., Meng Y., Wang K., Zhang X., Chen W., Sheng J., Qiu Y., Diao H., Li L. Inflammation and antiviral immune response associated with severe progression of COVID-19. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 631226. doi: 10.3389/fimmu.2021.631226
29. Zheng K.I., Feng G., Liu W.Y., Targher G., Byrne C.D., Zheng M.H. Extrapulmonary complications of COVID-19: a multisystem disease? *J. Med. Virol.*, 2021, vol. 93, no. 1, pp. 323–335. doi: 10.1002/jmv.26294

Авторы:

Кригер Е.А., к.м.н., научный сотрудник международного центра научных компетенций центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры инфекционных болезней Северного государственного медицинского университета, г. Архангельск, Россия;

Самодова О.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней Северного государственного медицинского университета, г. Архангельск, Россия;

Свитич О.А., д.м.н., профессор РАН, член-корреспондент РАН, директор ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

Самойликов Р.В., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Меремьянина Е.А., к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия; старший преподаватель кафедры вирусологии ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования МЗ РФ, Москва, Россия;

Иванова Л.В., клинический ординатор кафедры инфекционных болезней Северного государственного медицинского университета, г. Архангельск, Россия;

Бебякова Н.А., д.б.н., профессор, зав. кафедрой медицинской биологии и генетики Северного государственного медицинского университета, г. Архангельск, Россия;

Ильина Е.Н., д.б.н., член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник, зав. лабораторией математической биологии и биоинформатики НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Павленко А.В., научный сотрудник НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Есин Ю.И., лаборант НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Архипова А.Л., младший научный сотрудник НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Ковальчук С.Н., к.б.н., старший научный сотрудник НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Кудрявцев А.В., доктор философии в области наук о здоровье, зав. международным центром научных компетенций центральной научно-исследовательской лаборатории Северного государственного медицинского университета, г. Архангельск, Россия.

Authors:

Krieger E.A., PhD (Medicine), Researcher, International Research Competence Centre, Central Scientific Research Laboratory, Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation;

Samodova O.V., DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Infectious Diseases, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation;

Svitich O.A., DSc (Medicine), Professor of RAS, RAS Corresponding Member, Director of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Professor, Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, Erisman Institute of Public Health (and Healthcare Management), Sechenov University, Moscow, Russian Federation;

Samoilikov R.V., Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Meremianina E.A., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Senior Lecturer, Department of Virology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education MOH Russia, Moscow, Russian Federation;

Ivanova L.V., Resident Physician, Department of Infectious Diseases, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation;

Bebyakova N.A., DSc (Biology), Professor, Head of the Department of Medical Biology and Genetic, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation;

Ilina E.N., DSc (Biology), RAS Corresponding Member, Head Researcher, Head of the Laboratory of Mathematical Biology and Bioinformatics, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russian Federation;

Pavlenko A.V., Researcher, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russian Federation;

Esin Yu.I., Laboratory Assistant, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russian Federation;

Arhipova A.L., Junior Researcher, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russian Federation;

Kovalchuk S.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russian Federation;

Kudryavtsev A.V., PhD (Health Sciences), Head of the International Research Competence Centre, Central Scientific Research Laboratory, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation.

MOLECULAR AND GENETIC CHARACTERIZATION OF *LEPTOSPIRA* spp. COLLECTION STRAINS FROM THE ST. PETERSBURG PASTEUR INSTITUTE BASED ON 16S rRNA GENE SEQUENCING DATA

R.R. Baimova, Yu.V. Ostankova, O.V. Blinova, N.A. Stoyanova, N.K. Tokarevich

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

Abstract. Leptospirosis is a zoonotic disease found virtually worldwide. Microscopic Agglutination Test with live leptospira (MAT) is the reference method for the serological diagnosis of leptospirosis. MAT is based on assessing serum potential to agglutinate live reference serovar *Leptospira* maintained at a reference laboratory. At some laboratories having own collections of isolated and reference *Leptospira* strains applicable for serological diagnosis, those microorganisms are maintained for many years by repeated subculturing, that increases markedly a chance of strain cross-contamination. The lack of adequate quality control for reference strains may affect data of epidemiological studies. Control of *Leptospira* spp. reference strains purity and stability of their antigenic composition is very important for diagnosis of leptospirosis. The study objective was to compare the 16S rRNA gene nucleotide sequences of some *Leptospira* strains from the collection of the St. Petersburg Pasteur Institute to with relevant sequences uploaded to GenBank. In this study, 38 *Leptospira* strains were investigated. Nucleotide sequences of 36 strains were deposited in the international GenBank database, inconsistencies were revealed in two strains. The study found that the control *Leptospira* strains from the collection of the St. Petersburg Pasteur Institute had minimal dissimilarities from international control strains. The analysis of the resultant 16S rRNA sequences has shown the presence of point mutations, transitions, deletions and insertions, regardless of the strain species. The open leptospira pan-genome demonstrates high genomic variability in species due to the capability of leptospira for lateral gene transfer in order to adapt to changing environmental conditions. The massive acquisition and loss of genes give rise to an increased species diversity. The 16S rRNA gene is suitable for screening diagnostics; however, high level of the fragment similarity and close phylogenetic relationship between different species put bounds to its use in genotyping. The presence of point nucleotide mutations is most likely associated with the evolutionary mechanisms of leptospira, their ability to horizontal gene transfer and crossing-over, including ribosomal genes, but this assumption necessitates additional research. For specimen genotyping it is necessary to select alternative genes with high specificity and sufficient level of nucleotide divergence. The study shows a need for genetic analysis of collection strains in order to control the purity of cultures.

Key words: leptospirosis, leptospira, 16S rRNA, collection, zoonotic disease, cultivating.

Адрес для переписки:

Баимова Регина Равилевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 644-63-81. Факс: 8 (812) 232-92-17.
E-mail: baimova@pasteurorg.ru

Contacts:

Regina R. Baimova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 644-63-81. Fax: +7 (812) 232-92-17.
E-mail: baimova@pasteurorg.ru

Для цитирования:

Баимова Р.Р., Останкова Ю.В., Блинова О.В., Стоянова Н.А.,
Токаревич Н.К. Молекулярно-генетическая характеристика
коллекционных штаммов *Leptospira* spp. Санкт-петербургского
института Пастера на основе данных секвенирования гена 16S
рРНК // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1040–1048.
doi: 10.15789/2220-7619-MAG-17028

Citation:

Baimova R.R., Ostankova Yu.V., Blinova O.V., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K.
Molecular and genetic characterization of *Leptospira* spp. collection
strains from the St. Petersburg Pasteur institute based on 16S rRNA gene
sequencing data // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1040–1048. doi: 10.15789/2220-7619-
MAG-17028

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ *LEPTOSPIRA* spp. САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО ИНСТИТУТА ПАСТЕРА НА ОСНОВЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНА 16S рНК

Баимова Р.Р., Останкова Ю.В., Блинова О.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К.

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

Резюме. Лептоспироз является распространенным практически по всему миру зооантропонозным заболеванием. Эталонным методом для серологической диагностики лептоспироза является реакция микроскопической агглютинации с живыми лептоспирами (РМА). Этот метод основан на оценке способности сыворотки агглютинировать живые бактерии *Leptospira* эталонных сероваров, поддерживаемых в референс-лаборатории. В лабораториях, которые имеют коллекцию собственных изолированных и референсных штаммов *Leptospira*, используемых для серологической диагностики, эти микроорганизмы сохраняются в течение многих лет путем повторного пассирования, что значительно увеличивает шансы кросс-контаминации штаммов. Отсутствие адекватного контроля качества референсных штаммов может отрицательно повлиять на эпидемиологические исследования. Контроль чистоты и постоянства антигенного состава референсных штаммов *Leptospira* spp. имеет большое значение для диагностики лептоспироза. Целью данного исследования было сравнение нуклеотидных последовательностей гена 16S, некоторых коллекционных штаммов лептоспир Санкт-Петербургского Института им. Пастера, с последовательностями, загруженными в международную базу данных. В работе были изучены 38 штаммов лептоспир. Нуклеотидные последовательности 36 штаммов были депонированы в международную базу данных GenBank, в двух штаммах были обнаружены несоответствия. В результате исследования установлено, что контрольные штаммы *Leptospira* из коллекции Санкт-Петербургского института Пастера имеют минимальные отличия от международных контрольных штаммов. Анализ полученных последовательностей региона 16S рНК, показал наличие точечных мутаций, транзаций, делеций и инсерций, независимо от видовой принадлежности штамма. Открытый пангеном лептоспир демонстрирует высокую геномную вариабельность у видов, что обусловлено способностью лептоспир к латеральному переносу генов, с целью приспособления к изменяющимся условиям среды. Массовое приобретение и потеря генов ведут к увеличению разнообразия видов. Ген 16S рНК подходит для скрининговой диагностики, однако высокое сходство данного фрагмента и тесное филогенетическое родство разных видов ограничивает его использование для генотипирования. Наличие точечных нуклеотидных мутаций вероятнее всего связано с эволюционными механизмами лептоспир, их способностью к горизонтальному переносу генов и кроссинговеру, в том числе и рибосомальных генов, однако это предположение обуславливает необходимость проведения дополнительных исследований. Для генотипирования образцов необходим подбор альтернативных генов, с высокой специфичностью и достаточным уровнем дивергенции нуклеотидов. Проведенное исследование показывает необходимость проведения генетического анализа коллекционных штаммов с целью контроля чистоты культур.

Ключевые слова: лептоспироз, лептоспира, 16S рНК, коллекции, зоонозные заболевания, культивирование.

Introduction

Leptospirosis is a zoonotic disease occurring worldwide. The manifestations of its epidemic process are most typical for countries with humid, especially tropical and subtropical climates, as well as for the so-called developing countries, however, the disease cases occur as well in countries with temperate climates [21, 43]. Leptospirosis is endemic in tropical regions of Asia, Africa, Central and South America [45]. Numerous animal species including those synanthropic and farm livestock are considered as reservoir hosts of pathogenic *Leptospira*.

The epidemic state of leptospirosis varies significantly in European countries. In recent years, in non-endemic countries, there was an increase in imported leptospirosis due to the rise in popularity of ecotourism in regions with humid subtropical or tropical climates [1]. In Russia leptospirosis remains one of widespread zoonotic infections due to the exis-

tence of both natural and anthropurgic foci of leptospirosis in many administrative regions [2, 3, 4, 5, 6]. Some assessments come to more than 1 million severe cases of leptospirosis and about 60 000 fatal outcomes occur annually worldwide [16].

According to the serological classification, all currently recognized species of pathogenic *Leptospira* are categorized into more than 260 serovars [10]. Based on the phylogenetic classification, the genus *Leptospira* is divided into 64 species. In line with genome-wide analysis, the genus is divided into 2 clades: pathogens and saprophytes, which, in turn, are divided into 4 subclades (P1, P2, S1, S2). Subclades P1 and P2 involve 17 pathogenic and 21 intermediate species, respectively. Subclade S1 includes 22 saprophytic species, while subclade S2 includes 4 [37].

Leptospirosis in humans is mostly caused by *Leptospira interrogans*, *Leptospira borgpetersenii* or *Leptospira kirschneri* [9, 26, 35]. The pathogen can circulate in the environment for a long time thanks

to sensitive or reservoir hosts that shed bacteria in their urine, contaminating soil and water. Humans usually get infected through direct contacts of their damaged skin or mucous membranes with the urine of infected wild or domestic animals, or through indirect contacts with contaminated environment [8, 29, 36]. In humans, there is a variety of possible clinical manifestations of the disease, ranging from sub-clinical infection to severe progressive forms that can lead to death [19, 29, 39].

Laboratory confirmation of suspected cases is essential for the diagnosis of leptospirosis, as there is significant polymorphism of its clinical manifestations. Most cases are diagnosed through serological tests of patients' blood. Microscopic Agglutination Test with live *Leptospira* (MAT) is the reference method for the serological diagnosis of leptospirosis. MAT is based on the assessment of the serum ability to agglutinate live *Leptospira* of reference serovars maintained at a reference laboratory [22, 32, 42, 44]. At some laboratories that have their own collections of isolated and reference *Leptospira* strains applicable for serological diagnosis, those microorganisms are maintained for many years by repeated subculturing, that increases significantly the chance of strain cross-contamination [13, 14, 19, 26].

Contamination of strains in *Leptospira* reference collections may entail severe consequences. In an outbreak investigation, the pathogen serogroup is usually identified with the help of MAT. The lack of adequate quality control of reference strains may affect the results of epidemiological studies. Conventional serogroup control of reference strains is carried out using monoclonal antibodies or control sera samples [7, 28, 46].

Control of *Leptospira* spp. reference strains purity and stability of its antigenic composition is very important for the diagnosis of leptospirosis. Sequencing of 16S rRNA gene is a reliable method for molecular characterization of bacteria species, and it is applicable to *Leptospira* spp. [15, 25, 31, 38]. The method was considered to be an effective and simple tool for *Leptospira* species identification in the clinical setting. Its important advantages are fast analysis, wide availability, and relatively low cost. The study objective was to compare the 16S rRNA gene nucleotide sequences of some collection *Leptospira* strains, including reference strains, with sequences uploaded to GenBank.

Materials and methods

In this study, we investigated 38 *Leptospira* strains from the collection of the Laboratory of Zoonotic Infections at the St. Petersburg Pasteur Institute.

The cultures were characterized by serological tests using MAT [18]. The strains have undergone repeated subculturing at the laboratory for many decades. Cultivation was carried out in a liquid nutrient

medium based on distilled water containing 10% phosphate buffer with the addition of 10% rabbit blood serum. The strains were cultivated at 29°C. We used 7- to 14-days grown *Leptospira* cultures, containing at least 10⁷ microbial cells/ml. Genomic DNA was extracted using a QiaAmp DNA Mini kit (Qiagen, Germany) in compliance with the manufacturer's instruction. For PCR, two pairs of primers flanking a 1423 bp fragment were used. Primer sequence: 16S Out F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 16S Out R 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3' [28, 33]. A clinical sample was used for a positive amplification control. The presence of *Leptospira* DNA in it was confirmed by two commercial kits: AmpliSens® *Leptospira*-FRT (InterLabService Ltd., Russia), and BactoReal® Kit *Leptospira* spp. Multiplex (16S rDNA+LipL32) (Ingenetix GmbH, Austria). Clear-Band Nuclease Free Ultra-Pure Water (EcoTech Biotechnology Turkey) was used for a negative control.

PCR amplification was carried out in 25 µl of the amplification mixture with the addition of primers (15 M each) 67 mM plus Tris HCl (pH 8.8), 16.6 mM ammonium sulfate, 6.7 mM MgCl₂; 6.7 mM EDTA; 10 mM mercaptoethanol; 170 mg BCAA; 1.0 mM each dNTP; 1 unit Taq DNA polymerase (Fermentas). Denaturation (5 min at 94°C) was followed by 40 cycles of amplification: 30 s at 94°C, 30 s at 55°C, 1 min 20 s at 72°C, final elongation 7 min at 72°C.

The PCR products were separated on 2% agarose gel stained with ethidium bromide, in comparison with the GeneRuler 1Kb molecular weight marker (Thermo Scientific, USA). Electrophoresis was conducted for 40 minutes at 120V and visualized by UV radiation.

The amplification products were purified according to the procedure as follows: the mixture (including 2 µl of 3 M sodium acetate and 2 µl of 0.125 M EDTA, and 1 µl of glycogen) was added to 20 µl of the amplification product and incubated for 15 minutes at room temperature in the presence of chilled 96% ethanol. Centrifugation was carried out for 15 minutes at 4°C, 14 000 rpm/min. Then supernatant was removed and the precipitate was washed twice with cold 70% ethanol, repeating the cold centrifugation procedure. The washed precipitate was dried in the air at room temperature. For the quality analysis, the purified precipitate was dissolved in 30 µl of TE buffer and visualized on an agarose gel. The purified fragment of sufficient concentration was used to set up a sequence of reactions with forward and reverse primers. For analysis, the reaction product was dissolved in formamide and placed in an ABI Prism 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA).

The resulting strain sequences were compared with those available from the GenBank database.

For phylogenetic analysis, the MEGA11 software was used, the resulting sequences were aligned using the ClustalW algorithm. The sequence coverage length was 1144 bp. When constructing the tree,

the sequences of 16S region of *Borrelia* spp. from the international GenBank database, were chosen to be used for the outgroup. Based on the alignment, a tree was built using the Neighbor-joining method, bootstrap N = 1000.

Results

Nucleotide sequences of the 16S rRNA gene of 38 strains were obtained. The length of the sequences ranged from 1186 to 1423 bp. The sequences of 36 strains were deposited in the international GenBank database. For some details, such as serogroup of strain, date of isolation, origin and location see Table. The overall sequence similarity is 99%, the number of polyform variants of the gene among

the obtained sequences ranges from 1 to 20 nt, which is consistent with the results of previous studies [34].

Strain sequences were identified and validated using NCBI BLAST and by alignment in MEGA 11 (Fig. 1).

The sequence of the *L. borgpetersenii* strain Perepelicin, obtained at our laboratory, forms a cluster with foreign reference strains, although it differs by one nucleotide.

Reference strains of *L. kirschneri* and *L. interrogans* species, obtained by foreign researchers, are clustered together, indicating their high similarity and inapplicability of 16S rRNA gene to typing.

The results of comparison with nucleotide sequences of the 16S rRNA gene, obtained by other researchers, were mostly concordant, although some discrepancies were observed.

Table. Leptospira strain sequences deposited in GenBank

No. of strain sequence deposited in GenBank	Serogroup	Date of isolation	Origin	Location
OL703051	<i>Canicola</i>	1985	Human	Leningrad
OL703052	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1999	Human	Saint Petersburg
OL703053	<i>Canicola</i>	1962	Human	Kaliningrad
OL703054	<i>Canicola</i>	1969	Human	Kaliningrad
OL703055	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1992	Human	Leningrad
OL703056	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1991	Human	Leningrad
OL703057	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1992	Human	Leningrad
OL703058	<i>Canicola</i>	2008	Human	Saint Petersburg
OL703059	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1968	Human	Leningrad
OL703060	<i>Canicola</i>	1968	Human	Kaliningrad
OL703061	<i>Canicola</i>	1985	Human	Leningrad
OL703062	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1990	Human	Leningrad
OL703063	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1990	Human	Leningrad
OL703064	<i>Autumnalis</i>	1925	Human	Japan
OL703065	<i>Australis</i>	1951	<i>Erinaceus europaeus</i>	Moscow
OL703068	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	2018	Human	Saint Petersburg
OL703069	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1990	Human	Leningrad
OL825730	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	2009	Human	Saint Petersburg
OL825731	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1980	<i>Rattus norvegicus</i>	Leningrad
OL825732	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1954	<i>Rattus norvegicus</i>	Leningrad
OL825733	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1961	<i>Rattus norvegicus</i>	Leningrad
OL825734	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1991	Human	Leningrad
OL825735	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1997	Human	Saint Petersburg
OL825736	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1990	Human	Leningrad
OL825737	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1991	Human	Leningrad
KR080516	<i>Canicola</i>	1931	<i>Canis lupus familiaris</i>	Holland
KY075908	<i>Tarassovi</i>	1938	Human	Moscow
KY075909	<i>Pyrogenes</i>	1923	Human	Indonesia
KY075910	<i>Javanica</i>	1938	<i>Rattus rattus</i>	Indonesia
KY075911	<i>Australis</i>	1937	Human	Australia
KY075912	<i>Bataviae</i>	1938	Human	Indonesia
KY075913	<i>Autumnalis</i>	1938	Human	Congo
KR107202	<i>Sejroe</i>	1944	<i>Apodemus flavicollis</i>	Denmark
KR091970	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1935	Human	Denmark
KR091971	<i>Pomona</i>	1936	Human	Australia
KR091973	<i>Grippityphosa</i>	1929	Human	Moscow

The analysis of the resultant sequences of 16S rRNA region has shown the presence of point mutations, transitions, deletions and insertions, regardless of the strain species.

Three points with a variable nucleotide were found in 10 *L. interrogans* sequences obtained by us. In the sequences of GenBank strains thymine is more common at position 38, however, there are some strains with cytosine. The reverse is true for the strains here studied: only 8 of 36 strains contain thymine at this point, while the rest of them contain cytosine (Fig. 2).

The sequence of the *L. kirschneri* strain is 99.0% similar to that of the *L. interrogans* species, but 99.72% sequence identity was found by NCBI BLAST analysis.

In two strains out of 38, inconsistencies were revealed. The sequences of the collection strains of the species *L. borgpetersenii* and *L. noguchii* were analyzed and proved to be identical to the strains belonging to *L. interrogans*.

Discussion

Historically, *Leptospira* strains were classified according to their virulence, all saprophytic strains were assigned to *L. biflexa*, and pathogenic strains to *L. interrogans* [41]. Further subdivision of *Leptospira*, taking into account their antigenic determinants, was based on serological techniques [28].

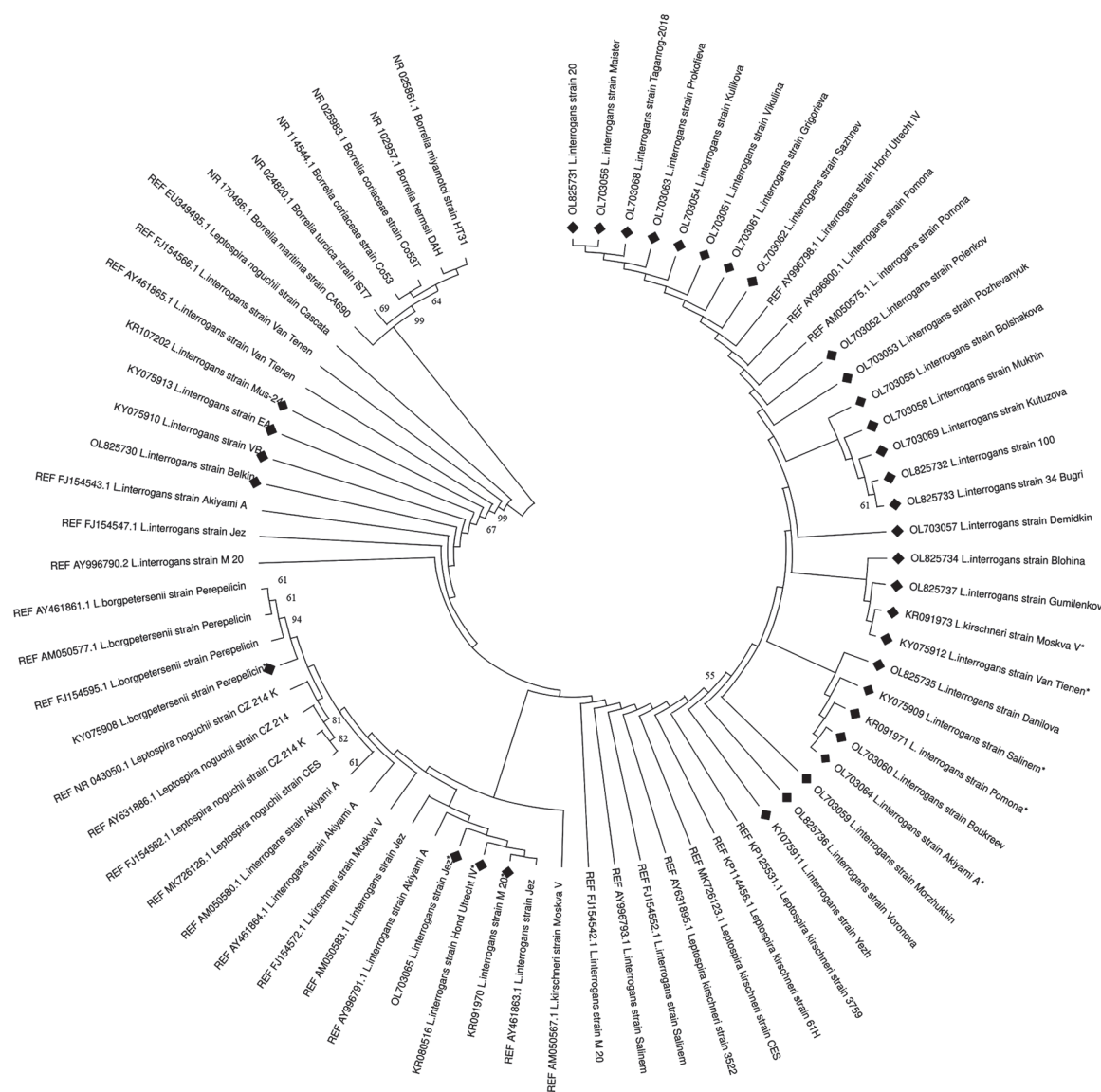


Figure 1. Phylogenetic tree built on the obtained *Leptospira* spp. 16S rRNA sequences and sequences of reference strains taken from GenBank

Note. REF — sequences of reference strains from GenBank. * — sequences of reference strains obtained at our laboratory. The studied strains are described in Table.

Leptospira classification was significantly expanded due to the introduction of such genetic techniques as DNA-DNA hybridization, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and Multilocus sequence typing [11, 13, 20]. Serological characteristics do not correlate with genovariants, one species of *Leptospira* may contain several serogroups, while one serogroup may include strains of different species. The open pangenome of *Leptospira* demonstrates high genomic variability in species due to the capability of *Leptospira* for lateral gene transfer in order to adapt to changing environmental conditions. The massive acquisition and loss of genes give rise to an increase in species diversity [24, 36].

Sequencing of the 16S rRNA region is currently the most accessible method for genotyping. This gene provides distinction between pathogenic, intermediate, and saprophytic clades, but its discriminatory ability is too low to distinguish between *Leptospira* genotypes. For example, it is impossible to differentiate *L. interrogans*, *L. kirschnerii*, and *L. noguchii*, since they differ by one or two bases only and belong to the same operational taxonomic unit (mOTU) that is shown by the phylogenetic tree (Fig. 1) [23]. The sequence of the *L. kirschnerii* strain obtained in our study also has a minimal difference only from the type strains of *L. interrogans*.

A large number of 16S rRNA sequences uploaded to GenBank are not full-length (< 1400 bp), therefore it is difficult to identify strains correctly. Long-term subculturing of *Leptospira* in collections does not exclude erroneous identification of sequences uploaded to public databases, it also can give rise to single mutations [12].

When sequencing this gene, it was found that the control strains of *Leptospira* from the collection of the St. Petersburg Pasteur Institute have minimal dissimilarities from international control strains and are applicable in serological diagnosis of leptospirosis.

In this study, two out of 38 strains did not match the sequences of similar strains uploaded to GenBank, which may be due to its contamination or mislabeling. Long-term storage of *Leptospira* by freezing is not available at all practical laboratories owing to its high price, therefore collection strains of *Leptospira* for many years undergo repeated subculturing, possibly resulting in strain mutations and increasing the risk of cross-contamination or erroneous labeling of samples. This justifies the need for genetic analysis of collections in order to circumvent the possible risks associated with under- or overdiagnosis.

The 16S rRNA gene is suitable for screening diagnostics; however, high level of the fragment similarity and close phylogenetic relationship between different species put bounds to its use in genotyping.

The presence of point nucleotide mutations is most likely associated with the evolutionary mechanisms of *Leptospira*, their ability to horizontal gene transfer and crossingover, including ribosomal genes, but this assumption necessitates additional research [34].

For genotyping of samples, it is necessary to select alternative genes with high specificity and a sufficient level of nucleotide divergence.

Nowadays numerous genetic targets have been proposed for *Leptospira* diagnosis and typing. The gene encoding the outer membrane lipoprotein of patho-

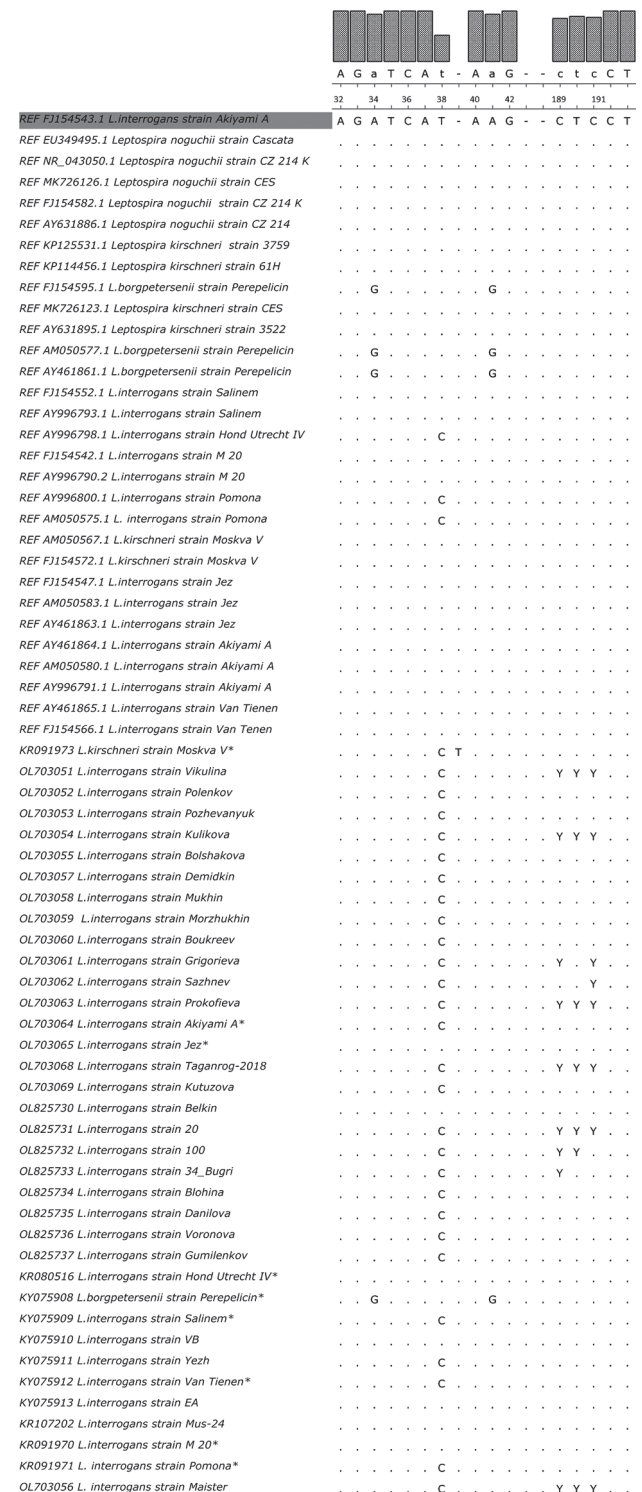


Figure 2. Multiple alignment of the obtained sequences with reference strains obtained from the international GenBank database
Note. The main differences are shown.

genic *Leptospira lipL32* is one of the most common alternatives to 16S rRNA, however, its use is also limited by its discriminating abilities, and it is mostly applied in screening diagnostics.

The housekeeping gene encoding the *secY* preprotein translocase is next in frequency of use; the use of this gene for *Leptospira* genotyping seems to be the most promising at the moment. Other proposed targets are: the gene encoding flagellin, the class B polypeptide subunit of periplasmic flagella *flaB*, the gene for the

β -subunit of RNA polymerase *rpoB*, and the genes *gyrB*, *Adk*, *glmU*, *LigB*, etc. [17, 27, 30, 40].

As a variety of targets is used by many researchers, the comparison of their results is hardly possible. Therefore, the lack of standardization is currently the main restriction on the molecular diagnosis of leptospirosis.

This study shows the need for genetic analysis of collection strains in order to control the purity of cultures.

References

1. 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, № 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 Diseases*, 2014, vol. 12, no. 3, pp. 95–99. (In Russ.)]
2. Самсонова А.П., Петров Е.М., Савельева О.В., Иванова А.Е., Шарапова Н.Е. Анализ документированных результатов исследования сывороток крови больных, подозрительных на заболевание лептоспирозами, в реакции микроагглютинации // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 875–890. [Samsonova A.P., Petrov E.M., Savelyeva O.V., Ivanova A.E., Sharapova N.E. Analyzing the documented results by using microscopic agglutination test to examine sera from patients suspected of leptospirosis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 875–890. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ATD-1758
3. Соболева Г.Л., Ананьина Ю.В., Непоклонова И.В. Актуальные вопросы лептоспироза людей и животных // Российский ветеринарный журнал. 2017. № 8. С. 14–18. [Soboleva G.L., Ananyina Y.V., Nepoklonova I.V. Actual problems of human and animal leptospirosis. *Rossiiskij veterinarnyj zhurnal = Russian Veterinary Journal*, 2017, no. 8, pp. 14–18. (In Russ.)]
4. Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Волкова Г.В., Грачева Н.А., Кравченко С.С., Кузина Н.В., Лисеева Т.М., Мациевская Е.А., Пьяных В.А., Снегирев В.И., Сосницкий В.И. Актуальные проблемы лептоспирозной инфекции в Северо-Западном федеральном округе // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2003. № 4 (11). С. 29–32. [Stoianova N., Tokarevich N., Gracheva L., Volkova G., Gracheva N., Kravchenko S., Kuzina N., Liseeva T., Matsievskaya E., Snegirev V., Sosnitsky V. Actual problems of leptospirosis infection in the Northwestern Federal District. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2003, no. 4 (11), pp. 29–32. (In Russ.)]
5. Стоянова Н.А., Сергейко Л.М., Слепцова В.И. Иммунологический мониторинг и эпидемиологические особенности лептоспироза в Санкт-Петербурге // Микробиология эпидемиология и иммунобиология. 1996. № 6. С. 120–122. [Stoianova N., Sergeiko L., Sleptsova V. Immunological monitoring and the epidemiological characteristics of leptospirosis in Saint Petersburg. *Mikrobiologiya epidemiologiya i immunobiologiya = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1996, no. 6, pp. 120–122. (In Russ.)]
6. Токаревич Н.К., Стоянова Н.А. Эпидемиологические аспекты антропогенного влияния на эволюцию лептоспирозов // Инфекция и иммунитет. 2011. Т. 1, № 1. С. 67–76. [Tokarevich N.K., Stoyanova N.A. Epidemiological aspects of anthropogenic influence to leptospirosis evolution. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2011, vol. 1, no. 1, pp. 67–76. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2011-1-67-76
7. Behera S.K., Sabarinath T., Ganesh B., Mishra P.K.K., Niloofa R., Senthilkumar K., Verma M.R., Hota A., Chandrasekar S., Deneke Y., Kumar A., Nagarajan M., Das D., Khatua S., Sahu R., Ali S.A. Diagnosis of human leptospirosis: comparison of microscopic agglutination test with recombinant LigA/B antigen-based In-house IgM dot ELISA dipstick test and latex agglutination test using bayesian latent class model and MAT as gold standard. *Diagnostics (Basel)*, 2022, vol. 12, no. 6: 1455. doi: 10.3390/diagnostics12061455
8. 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., Vinetz J.M.; Peru-United States Leptospirosis Consortium. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.*, 2003, vol. 3, no. 12, pp. 757–771. doi: 10.1016/s1473-3099(03)00830-2
9. Boonsilp S., Thaipadungpanit J., Amornchai P., Wuthiekanun V., Bailey M.S., Holden M.T., Zhang C., Jiang X., Koizumi N., Taylor K., Galloway R., Hoffmaster A.R., Craig S., Smythe L.D., Hartskeerl R.A., Day N.P., Chantratita N., Feil E.J., Aanensen D.M., Spratt B.G., Peacock S.J. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2013, vol. 7, no. 1: e1954. doi: 10.1371/journal.pntd.0001954
10. Bourhy P., Collet L., Brisse S., Picardeau M. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2014, vol. 64, pt. 12, pp. 4061–4067. doi: 10.1099/ijse.0.066597-0
11. Brenner D.J., Kaufmann A.F., Sulzer K.R., Steigerwalt A.G., Rogers F.C., Weyant R.S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiroaceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, vol. 49, pt. 2, pp. 839–858. doi: 10.1099/00207713-49-2-839
12. Cerqueira G.M., McBride A.J., Queiroz A., Pinto L.S., Silva E.F., Hartskeerl R.A., Reis M.G., Ko A.I., Dellagostin O.A. Monitoring *Leptospira* strain collections: the need for quality control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2010, vol. 82, no. 1, pp. 83–87. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0558
13. Chappel R.J., Goris M., Palmer M.F., Hartskeerl R.A. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 12, pp. 5484–5488. doi: 10.1128/JCM.42.12.5484-5488.2004

14. Chen H.W., Lukas H., Becker K., Weissenberger G., Halsey E.S., Guevara C., Canal E., Hall E., Maves R.C., Tilley D.H., Kuo L., Kochel T.J., Ching W.M. An improved enzyme-linked immunoassay for the detection of Leptospira-specific antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2018, vol. 99, no. 2, pp. 266–274. doi: 10.4269/ajtmh.17-0057
15. Clarridge J.E. 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, vol. 17, no. 4, pp. 840–862. doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004
16. Costa F., Hagan J.E., Calcagno J., Kane M., Torgerson P., Martinez-Silveira M.S., Stein C., Abela-Ridder B., Ko A.I. Global morbidity and mortality of Leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2015, vol. 9, no. 9: e0003898. doi: 10.1371/journal.pntd.0003898
17. Di Azevedo M.I.N., Lilenbaum W. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2021, vol. 72, no. 5, pp. 496–508. doi: 10.1111/lam.13442
18. Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P. “Leptospira” and leptospirosis. *Melbourne: MediSci*, 1999. 295 p.
19. Fortes-Gabriel E., Guedes M.S., Shetty A., Gomes C.K., Carreira T., Vieira M.L., Esteves L., Mota-Vieira L., Gomes-Solecki M. Enzyme immunoassays (EIA) for serodiagnosis of human leptospirosis: specific IgG3/IgG1 isotyping may further inform diagnosis of acute disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2022, vol. 16, no. 2: e0010241. doi: 10.1371/journal.pntd.0010241
20. Fouts D.E., Matthias M.A., Adhikarla H., Adler B., Amorim-Santos L., Berg D.E., Bulach D., Buschiazzi A., Chang Y.F., Galloway R.L., Haake D.A., Haft D.H., Hartskeerl R., Ko A.I., Levett P.N., Matsunaga J., Mechaly A.E., Monk J.M., Nascimento A.L., Nelson K.E., Palsson B., Peacock S.J., Picardeau M., Ricaldi J.N., Thaipandungpanit J., Wunder E.A. Jr., Yang X.F., Zhang J.J., Vinetz J.M. What makes a bacterial species pathogenic? Comparative genomic analysis of the genus Leptospira. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2016, vol. 10, no. 2: e0004403. doi: 10.1371/journal.pntd.0004403
21. Ghazaei C. Pathogenic Leptospira: advances in understanding the molecular pathogenesis and virulence. *Open Vet. J.*, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 13–24. doi: 10.4314/ovj.v8i1.4
22. Guedes I.B., de Souza G.O., de Paula Castro J.F., Cavalini M.B., de Souza Filho A.F., Maia A.L.P., Dos Reis E.A., Cortez A., Heinemann M.B. Leptospira interrogans serogroup Pomona strains isolated from river buffaloes. *Trop. Anim. Health Prod.*, 2021, vol. 53, no. 2: 194. doi: 10.1007/s11250-021-02623-4
23. Guernier V., Allan K.J., Goarant C. Advances and challenges in barcoding pathogenic and environmental Leptospira. *Parasitology*, 2018, vol. 145, no. 5, pp. 595–607. doi: 10.1017/S0031182017001147
24. Haake D.A., Suchard M.A., Kelley M.M., Dundoo M., Alt D.P., Zuerner R.L. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, no. 9, pp. 2818–2828. doi: 10.1128/JB.186.9.2818-2828.2004
25. Hookey J.V., Bryden J., Gatehouse L. The use of 16S rDNA sequence analysis to investigate the phylogeny of Leptospiraceae and related spirochaetes. *J. Gen. Microbiol.*, 1993, vol. 139, no. 11, pp. 2585–2590. doi: 10.1099/00221287-139-11-2585
26. Jayasundara D., Senavirathna I., Warnasekara J., Gamage C., Siribaddana S., Kularatne S.A.M., Matthias M., Mariet J.F., Picardeau M., Agampodi S., M Vinetz J. 12 novel clonal groups of Leptospira infecting humans in multiple contrasting epidemiological contexts in Sri Lanka. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2021, vol. 15, no. 3: e0009272. doi: 10.1371/journal.pntd.0009272
27. Khodaverdi Darian E., Forghanifard M.M., Moradi Bidhendi S., Chang Y.F., Yahaghi E., Esmaelizad M., Khaleghizadeh M., Khaki P. Cloning and sequence analysis of LipL32, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic Leptospira spp. *Iran. Red Crescent Med. J.*, 2013, vol. 15, no. 11: e8793.
28. Kmety E., Dikken H. Classification of the species Leptospira interrogans and history of its serovars. *Groningen: University Press Groningen*, 1993. 104 p.
29. Ko A.I., Goarant C., Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, vol. 7, no. 10, pp. 736–747. doi: 10.1038/nrmicro2208
30. Lam J.Y., Low G.K., Chee H.Y. Diagnostic accuracy of genetic markers and nucleic acid techniques for the detection of Leptospira in clinical samples: a meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2020, vol. 14, no. 2: e0008074. doi: 10.1371/journal.pntd.0008074
31. Landolt N.Y., Chiani Y.T., Pujato N., Jacob P., Schmeling M.F., García Efron G., Vanasco N.B. Utility evaluation of two molecular methods for Leptospira spp. typing in human serum samples. *Heliyon*, 2022, vol. 9, no. 2: e12564. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e12564
32. Levett P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001, vol. 14, no. 2, pp. 296–326. doi: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001
33. Masuzawa T., Sakakibara K., Saito M., Hidaka Y., Villanueva S.Y.A.M., Yanagihara Y., Yoshida S.I. Characterization of Leptospira species isolated from soil collected in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 55–59. doi: 10.1111/1348-0421.12551
34. Morey R.E., Galloway R.L., Bragg S.L., Steigerwalt A.G., Mayer L.W., Levett P.N. Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 10, pp. 3510–3516. doi: 10.1128/JCM.00670-06
35. Philip N., Bahtiar Affendy N., Ramli S.N.A., Arif M., Raja P., Nagandran E., Renganathan P., Taib N.M., Masri S.N., Yuhana M.Y., Than L.T.L., Seganathirajah M., Goarant C., Goris M.G.A., Sekawi Z., Neela V.K. Leptospira interrogans and Leptospira kirschneri are the dominant Leptospira species causing human leptospirosis in Central Malaysia. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2020, vol. 14, no. 3: e0008197. doi: 10.1371/journal.pntd.0008197
36. Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 15, no. 5, pp. 297–307. doi: 10.1038/nrmicro.2017.5
37. Picardeau M. Leptospira and Leptospirosis. *Methods Mol. Biol.*, 2020, vol. 2134, pp. 271–275. doi: 10.1007/978-1-0716-0459-5_24
38. Postic D., Riquelme-Sertour N., Merien F., Perolat P., Baranton G. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between Leptospira collections: application to L. meyeri. *Res. Microbiol.*, 2000, vol. 151, no. 5, pp. 333–341. doi: 10.1016/s0923-2508(00)00156-x
39. Rajapakse S. Leptospirosis: clinical aspects. *Clin. Med. (Lond)*, 2022, vol. 22, no. 1, pp. 14–17. doi: 10.7861/clinmed.2021-0784
40. Slack A.T., Symonds M.L., Dohnt M.F., Smythe L.D. Identification of pathogenic Leptospira species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol.*, 2006, vol. 6: 95. doi: 10.1186/1471-2180-6-95
41. Stimson A.M. Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Public Health Reports*, 1907, vol. 22, no. 18, p. 541. doi: 10.2307/4559008

42. Strutzberg-Minder K., Ullerich A., Dohmann K., Boehmer J., Goris M. Comparison of two *Leptospira* type strains of serovar Grippotyphosa in Microscopic Agglutination Test (MAT) diagnostics for the detection of infections with Leptospire in horses, dogs and pigs. *Vet. Sci.*, 2022, vol. 9, no. 9: 464. doi: 10.3390/vetsci9090464
43. Sugunan A.P., Vijayachari P., Sharma S., Roy S., Manickam P., Natarajaseenivasan K., Gupte M.D., Sehgal S.C. Risk factors associated with leptospirosis during an outbreak in Middle Andaman, India. *Indian J. Med. Res.*, 2009, vol. 130, vol. 1, pp. 67–73.
44. Sykes J.E., Gamage C.D., Haake D.A., Nally J.E. Understanding leptospirosis: application of state-of-the-art molecular typing tools with a One Health lens. *Am. J. Vet. Res.*, 2022, vol. 83, no. 10: ajvr.22.06.0104. doi: 10.2460/ajvr.22.06.0104
45. Torgerson P.R., Hagan J.E., Costa F., Calcagno J., Kane M., Martinez-Silveira M.S., Goris M.G., Stein C., Ko A.I., Abela-Ridder B. Global burden of Leptospirosis: estimated in terms of disability adjusted life years. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2015, vol. 9, no. 10: e0004122. doi: 10.1371/journal.pntd.0004122
46. Zhang C., Yang H., Li X., Cao Z., Zhou H., Zeng L., Xu J., Xu Y., Chang Y.F., Guo X., Zhu Y., Jiang X. Molecular typing of pathogenic *Leptospira* serogroup Icterohaemorrhagiae strains circulating in China during the past 50 years. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2015, vol. 9, no. 5: e0003762. doi: 10.1371/journal.pntd.0003762

Авторы:

Баймова Р.Р., младший научный сотрудник лаборатории зооантропонозных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Останкова Ю.В., к.б.н., зав. лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии 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;

Стоянова Н.А., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории зооантропонозных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Токаревич Н.К., д.м.н., профессор, зав. лабораторией зооантропонозных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Baimova R.R., Junior Researcher, Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of HIV Immunology and Virology; Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, 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;

Stoyanova N.A., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Tokarevich N.K., DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

ВЛИЯНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК *ESCHERICHIA COLI* НА ИХ АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПРИ ОПИСТОРХОЗНОЙ ИНВАЗИИ

Л.В. Катаева, Н.Ф. Карпукхина, А.А. Вакарина, О.Н. Колотова, Т.Ф. Степанова, К.Б. Степанова

ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Тюмень, Россия

Резюме. *Введение.* Инвазия *Opisthorchis felineus* в организме человека вызывает воспалительные и дискинетические нарушения желудочно-кишечного тракта, сопровождающиеся изменениями фенотипических особенностей микробиоты толстой кишки. Цель исследования — изучение влияния фенотипических характеристик изолятов *Escherichia coli* в отношении бактерий *Klebsiella* spp., выделенных из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом «Описторхоз», на их антагонистическую активность. *Материалы и методы.* Изучены фенотипические свойства 54 изолятов *E. coli* и 8 — бактерий рода *Klebsiella*, выделенных из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом «Описторхоз». Идентификация изолятов, анализ протеомных профилей выполнен с использованием программного обеспечения Maldi BioTyper 3.0. Проведено 204 исследования антагонистической активности изолятов *E. coli* с различными свойствами в отношении *Klebsiella* spp. методом совместного культивирования. Изоляты *E. coli* и *Klebsiella* spp. изучены методом полногеномного секвенирования. *Результаты.* Бактерии *E. coli* с типичными фенотипическими характеристиками проявляли достоверно более выраженную антагонистическую активность в отношении *Klebsiella* spp. Установлен статистически достоверно более высокий уровень антагонистической активности в отношении бактерий *K. oxytoca*, чем при взаимодействии со штаммами *K. pneumoniae*. Протеомные профили штаммов разделились на кластеры в зависимости от уровня антагонистической активности. Молекулярное серотипирование *E. coli* по O- и H-антигенам в 60,0% случаев выявило гены энтеротоксигенных, энтероинвазивных и внекишечных патогенов. Определены штаммы, обладающие максимально высокими показателями индекса антагонистической активности, являющиеся носителями генов энтеротоксигенных *E. coli* сиквенс-серотипов O6:H11 и O6:H5. Геном этих штаммов включал наибольшее количество комплексов генов вирулентности: адгезинов, инвазинов, токсинов, бактериоцинов. Мультилокусное сиквенс-типирование и сиквенс-серотипирование штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* установило их гетерогенность, изоляты *K. oxytoca* определены как ST242 и ST176. Для всех штаммов была характерна гомология маркеров антибиотикорезистентности (*oqxA*, *oqxB*, *fosA*) и разнообразие вариантов генов резистентности к бета-лактамам антибиотикам. *Заключение.* Установлено, что изоляты *E. coli*, обладающие типичными фенотипическими характеристиками и являющиеся носителями комплексов генов вирулентности, проявляли достоверно более выраженную антагонистическую активность в отношении *Klebsiella* spp., изолированных из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом «Описторхоз».

Ключевые слова: антагонистическая активность, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, протеинограммы, молекулярное серотипирование, сиквенс-типы, комплексы генов вирулентности, маркеры резистентности.

Адрес для переписки:

Катаева Любовь Владимировна
625026, Россия, г. Тюмень, ул. Республики, 147,
ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 909 740-50-74.
E-mail: KataevaLV@Tniikip.rosпотребнадzor.ru

Contacts:

Lyubov V. Kataeva
625026, Russian Federation, Tyumen, Republic str., 147,
Tyumen Region Infection Pathology Research Institute.
Phone: +7 909 740-50-74.
E-mail: KataevaLV@Tniikip.rosпотребнадzor.ru

Для цитирования:

Катаева Л.В., Карпукхина Н.Ф., Вакарина А.А., Колотова О.Н.,
Степанова Т.Ф., Степанова К.Б. Влияние фенотипических
характеристик *Escherichia coli* на их антагонистическую активность
при описторхозной инвазии // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6.
С. 1049–1057. doi: 10.15789/2220-7619-ECP-13303

Citation:

Kataeva L.V., Karpukhina N.F., Vakarina A.A., Kolotova O.N., Stepanova T.F.,
Stepanova K.B. *Escherichia coli* phenotypic characteristics and antagonistic
activity in opisthorchiasis invasion // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1049–1057.
doi: 10.15789/2220-7619-ECP-13303

ESCHERICHIA COLI PHENOTYPIC CHARACTERISTICS AND ANTAGONISTIC ACTIVITY IN OPISTHORCHIASIS INVASION

Kataeva L.V., Karpukhina N.F., Vakarina A.A., Kolotova O.N., Stepanova T.F., Stepanova K.B.

Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation

Abstract. *Opisthorchis felineus* invasion in human causes inflammatory and dyskinetic disorders of the gastrointestinal tract accompanied by altered phenotypic characteristics in colon microbiota. The aim of research — study an impact of the *Escherichia coli* isolate phenotypic characteristics on *Klebsiella* spp. bacteria, isolated from colonic contents of patients with diagnosed opisthorchiasis as well as *E. coli* antagonistic activity. **Materials and methods.** The phenotypic properties of 54 *E. coli* isolates and 8 genus *Klebsiella* isolates obtained from colonic contents of patients with diagnosed opisthorchiasis were assessed. Identification of isolates and analysis of proteomic profiles were performed using Maldi BioTyper 3.0 software. 204 co-cultivation datasets were analyzed investigating antagonistic activity of *E. coli* isolates with varying properties on *Klebsiella* spp. *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolates were examined by whole genome sequencing. **Results.** *E. coli* bacteria with typical phenotypic characteristics showed significantly more prominent antagonistic activity against *Klebsiella* spp. A significantly higher level of antagonistic activity against *K. oxytoca* bacteria vs *K. pneumoniae* strains. The proteomic bacterial strain profiles were divided into clusters depending on the level of antagonistic activity. *E. coli* molecular serotyping for O- and H-antigens revealed the genes of enterotoxigenic, enteroinvasive and extraintestinal pathogens in 60.0% of cases. Strains with the highest antagonistic activity index, which are carriers of the genes typical to enterotoxigenic *E. coli* sequence serotypes O6:H1 and O6:H5, were identified. The genome of such strains consisted of the largest number of virulence gene complexes: adhesins, invasins, toxins, bacteriocins. Multilocus sequence typing and sequence serotyping of *E. coli* and *K. pneumoniae* strains established their heterogeneity; *K. oxytoca* isolates were identified as ST242 and ST176. All strains were characterized by homology of antibiotic resistance markers (*oqxA*, *oqxB*, *fosA*) and a variety of beta-lactam resistance gene variants. **Conclusion.** It was found that *E. coli* isolates with typical phenotypic characteristics and carriers of virulence gene complexes exhibited significantly more pronounced antagonistic activity against *Klebsiella* spp. isolated from colonic contents of patients with diagnosed opisthorchiasis.

Key words: antagonistic activity, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, proteinograms, molecular serotyping, sequence types, virulence gene complexes, resistance markers.

Введение

Кишечная микробиота — одна из основных гомеостатических систем организма, дисбаланс которой становится причиной многих соматических и инфекционных заболеваний. Паразитирование гельминтов в организме хозяина, вызывает патологические изменения тканей и органов, усугубляя нарушение микробиоценоза [15]. Описторхоз, относящийся к группе биогельминтозов, наносит немалый ущерб здоровью населения. Течение болезни при данной нозологии нередко сопровождается хронизацией процесса и необратимыми осложнениями [3].

Различные виды и биотопы микроорганизмов находятся в состоянии топической и пищевой конкуренции, обеспечивающей образование синтрофных связей, обмен генетическим материалом, формирование консорциумов, реализующиеся в механизме антагонизма [2]. Феномен оппозиционного влияния микросимбионтов на их биологические свойства (антагонистический, антилизоцимный, персистентный потенциал и биопленкообразование) позволяет реализовать распознавание чужеродных патогенов в микробиоте [4]. В частности, жизнедеятельность гельминта *O. felineus* в организме «хозяина» оказывает системное влияние на микробиоту желчевыводящих путей ки-

шечного биотопа, приводящее к изменению ее вирулентных свойств и нарушению барьерной функции [15]. Паразитарные инвазии способствуют нарушению симбиотических и синергических взаимоотношений бактерий в макроорганизме, обеспечивая трансформацию таксономического состава микробиоты, изменение факторов и механизмов микробной регуляции. Активация антагонистических свойств культуры осуществляется при условии улучшения ее метаболических и ростовых характеристик. Ингибирование антагонистической активности бактерий — представителей нормобиоты связано с подавлением их антимикробных факторов и функциональных свойств патогенами, а также с негативным действием на активность генов, экспрессирующих продукты обмена [12].

Постоянный представитель кишечной микробиоты млекопитающих *E. coli*, преимущественно не проявляет патогенной активности, однако в последнее время отмечается ее способность к продукции токсинов [6]. Установлено, что при описторхозной инвазии в составе кишечной микробиоты человека выявляются *E. coli*, в геноме которых обнаруживаются маркеры патогенных *E. coli* — носителей кластеров O-антигенов и H-антигенов, ассоциированных с вирулентностью. Обмен мобильными генетическими элементами ведет к появлению новых вариантов *E. coli*, обладающих генами,

кодирующими различные факторы патогенности [15], провоцируя аномальные воспалительные реакции, различные дегенеративные и злокачественные эффекты в пораженном органе.

Некоторые комменсальные штаммы бактерий могут контролировать рост патогенных бактерий, однако при инвазии *O. felinus* количество их бактериальных клеток снижается и приводит к изменению микробиоты кишечника, что показано на экспериментальной модели (инвазированные хомяки) [20].

Одним из основных микробных патогенов при описторхозной инвазии являются бактерии рода *Klebsiella* spp. (в $19,6 \pm 7,4\%$ случаев) [15]. Классический тип *K. pneumoniae* чаще вызывает инфекции у ослабленных реанимационных пациентов, в то время как гипервирулентные штаммы с гипермукоидным фенотипом вызывают тяжелые инфекции у ранее здоровых пациентов [10]. *K. oxytoca* также вызывает нозокомиальные и внебольничные инфекции, может быть причиной тяжелого геморрагического колита [8].

Таким образом, изучение функционирования микропаразитоценоза при инфекционно-инвазионном процессе представляется актуальной проблемой, в том числе с позиций молекулярно-генетических исследований. Чрезвычайно важно изыскание новых подходов для профилактики инфекций и дальнейших исследований по снижению риска осложнений воспалительного характера после дегельминтизации.

Цель исследования — определить антагонистическую активность изолятов *E. coli* в отношении бактерий *Klebsiella* spp., выделенных из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом «Описторхоз».

Материалы и методы

Изучены фенотипические свойства 54 изолятов *E. coli* и 8 — бактерий рода *Klebsiella* (3 — *K. oxytoca*; 5 — *K. pneumoniae*), выделенных из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом «Описторхоз». Штаммы *E. coli* разделены по биохимическим свойствам на группы: ферментирующие/не ферментирующие лактозу (Lac+/Lac–); обладающие/не обладающие гемолитической активностью (Gem+/Gem–); подвижные/неподвижные (подв./подв.–). Микробиологические исследования проводились классическим бактериологическим методом. Видовую идентификацию бактерий подтверждали методом масс-спектрометрии с использованием программного обеспечения *Maldi BioTyper 3.0*. Уровень идентификации изолятов выше 2.0 свидетельствовал о высокой достоверности. Пакет прикладных программ позволил изучить протеомный профиль всех исследован-

ных штаммов, свидетельствующий о гомологии их белковых спектров и выражающийся коэффициентом корреляции.

Проведено 204 исследования антагонистической активности изолятов *E. coli* с различными свойствами в отношении бактерий *Klebsiella* spp. Определение АА бактерий проводили по методике совместного культивирования в жидкой питательной среде. Для этого суточную агаровую культуру смывали стерильным физиологическим раствором и готовили суспензию, содержащую 500 млн микробных клеток в 1 мл. В 5,0 мл мясо-пептонного бульона (МПБ) с pH 7,2–7,4 вносили 1,0 мл взвеси *E. coli* и 0,1 мл — *Klebsiella* spp. Суспензию инкубировали при 37°C и через 24, 48 и 72 ч из бульонных культур готовили ряд последовательных десятикратных разведений. Из разведений 10^{-5} и 10^{-6} производили высевы по 0,1 мл, в двойной повторности на чашки Петри со средой Левина. Посевы выдерживали в термостате при 37°C 18–20 ч, после чего подсчитывали число выросших колоний *E. coli* и *Klebsiella* spp. на каждой чашке отдельно. Значение индекса антагонистической активности (ИАА) вычисляли по формуле (%):

$$\text{ИАА} = \frac{K}{K + \Phi} \times 100,$$

где *K* — число колоний *E. coli*; Φ — число колоний *Klebsiella* spp. (объекта антагонизма), выросших на плотной питательной среде при высевах из МПБ после сокультивирования.

Все штаммы *E. coli* по выраженности АА были разделены на три группы. В группу с низкой АА были отнесены штаммы с показателем ≤ 29 ; штаммы с показателем от 30 до 70 составили среднюю группу; штаммы, которые имели ИАА более 70, характеризовали как обладающие высокой АА.

Определение и оценка чувствительности к антибиотикам изолятов *E. coli* и *Klebsiella* spp. осуществлялись по минимальной подавляющей концентрации (МПК) в автоматическом режиме (Sensititre Aris 2x).

Штаммы *E. coli* и *K. pneumoniae* изучены методом полногеномного секвенирования. Полученные единичные прочтения для каждого штамма были собраны в контиги при помощи программы *Unicycler v.0.4.7*. Образцы с величиной средних покрытий геномов выше 200 свидетельствовали о достаточном объеме данных. Обработка результатов полногеномного секвенирования проводилась с помощью программного обеспечения анализа метагеномных образцов *Kraken Metagenomics version 2* (классификатор родов — коротких нуклеотидных последовательностей). Филогенетические исследования осуществляли в программе *Wombac 2.0*, которая позволяла находить коровые SNP в нуклеотидных

последовательностях и производить выравнивание этих полиморфизмов. Для определения О-антигенов и капсульных антигенов штаммов *K. pneumoniae* использовали сервер Kaptive. Определение сиквенс типов осуществляли с использованием сервера MLST 2.0 (Multi-Locus Sequence Typing) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST>), а также программой Lasergene.

Статистическая обработка полученных данных и визуализация результатов были проведены в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Для анализа применялись методы статистической обработки с применением программы SPSS, версия 22. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений, процентных долей и доверительных интервалов (95% ДИ) — метод Клоппера–Пирсона. Анализ статистической значимости различий ИАА проведен с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и таблиц сопряженности по критерию хи-квадрат Пирсона (χ^2). Различия полученных значений считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Фенотипические исследования изолятов *E. coli*, выделенных из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом описторхоз показали, что в их структуре преобладали лактозопозитивные, не обладающие гемолитической активностью и подвижные штаммы (рис. 1). Изоляты *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*, идентифицированные в этой же группе пациентов, характеризовались проявлением типичных для этих видов свойств. При исследовании изолятов *E. coli* и *Klebsiella* spp.

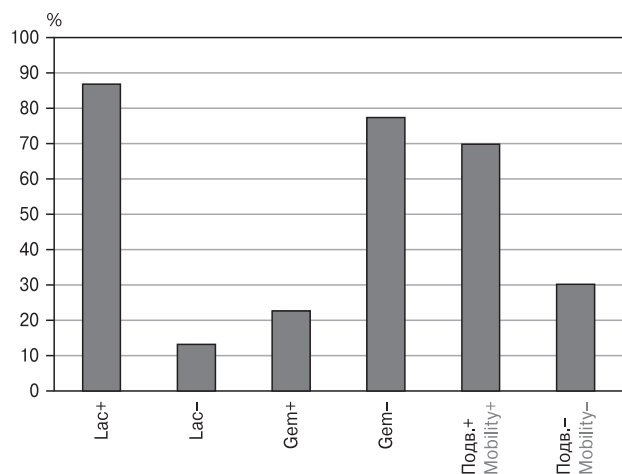


Рисунок 1. Структура изолятов *E. coli*, выделенных из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом «Описторхоз», по фенотипическим характеристикам, %

Figure 1. The pattern of *E. coli* isolates obtained from large intestine contents of patients with diagnosed opisthorchiasis based on phenotypic characteristics, %

на чувствительность к антибиотикам установлено, что все они были чувствительны к цефалоспорином, карбапенемам, защищенным пенициллинам, хлорамфениколу, триметоприму/сульфаметоксазолу и аминогликозидам.

Изучение антагонистической активности изолятов *E. coli* в отношении бактерий рода *Klebsiella* выявило повышение ИАА с 33,7% (95% ДИ: 17,5–28,5) в первые сутки совместного культивирования бактерий до 54,1% (95% ДИ: 17,5–28,5) к 3-м суткам. Средний показатель ИАА составил 45,4% (95% ДИ: 17,5–28,5). Увеличение значений индекса АА штаммов *E. coli* не зависело от их фенотипических свойств за весь период наблюдения (рис. 2). Вместе с тем сравнительный анализ показателей ИАА штаммов *E. coli* в группах, ферментирующих лактозу и обладающих подвижностью, в 1,3 раза выше при сравнении с аналогичными показателями изолятов с противоположными свойствами на вторые сутки наблюдения. Статистически значимые более высокие показатели ИАА установлены на вторые и третьи сутки наблюдения только по подвижности штаммов (непараметрический критерий Манна–Уитни, $p = 0,002$ и $p = 0,001$ соответственно).

В структуре всех штаммов на долю *E. coli*, обладающих низкой антагонистической активностью (ИАА ≤ 20), пришлось 22,2% (95% ДИ: 12,04–35,6), с высокой антагонистической активностью (ИАА > 70) — 48,1% (95% ДИ: 34,34–62,16).

Таким образом, все штаммы *E. coli* с типичными фенотипическими характеристиками

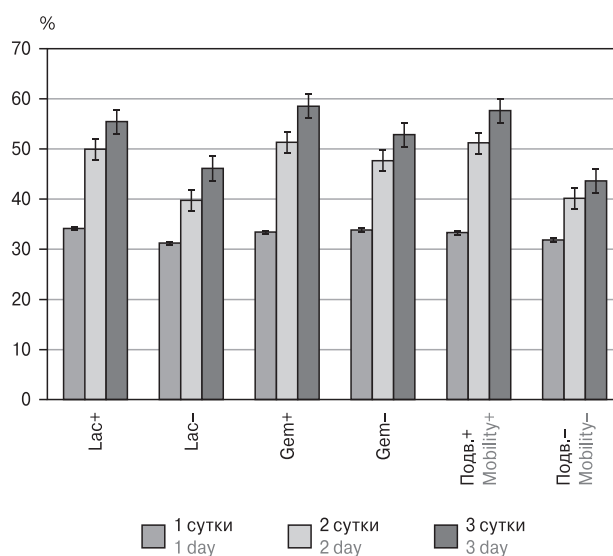


Рисунок 2. Сравнительная характеристика ИАА изолятов *E. coli*, отличающихся по фенотипическим свойствам, в динамике по суткам, %

Figure 2. Comparative characteristics of IAA of *E. coli* isolates differing in phenotypic properties, daily dynamics, %

(Lac+, Gem–, подв.+), проявляли более выраженную антагонистическую активность в отношении *Klebsiella* spp. при сравнении с ИАА штаммов, проявляющих противоположные признаки. Данные подтверждены статистическим анализом с применением непараметрического критерия Манна–Уитни, $p = 0,027$.

Все штаммы *E. coli*, исследованные на антагонистическую активность, и *Klebsiella* spp. подвергли протеомному анализу. Сравнение белковых спектров штаммов *E. coli*, обладающих низкой антагонистической активностью, выявило два кластера (рис. 3А). Коэффициент корреляции протеинограмм бактерий первого и второго кластера составил 0,80, что свидетельствует о значительной схожести этих штаммов.

Дендрограммы штаммов *E. coli*, обладающих высокой антагонистической активностью, различались по степени филогенетического родства и распределились на 4 кластера (рис. 3Б). Анализ протеинограмм установил гетерогенность белковых профилей этой группы *E. coli*, что подтверждается умеренным показателем коэффициента корреляции — 0,65. Четвертый кластер представлен максимальным количеством штаммов (15), которые по фенотипическим свойствам отличались незначительно, коэффициент корреляции их протеинограмм составил 0,7. Генетически сходные штаммы (большая их часть) разлагали лактозу, были подвижными и не обладали гемолитической активностью.

Анализ спектральных профилей штаммов *Klebsiella* spp. показал разделение их по видам: *K. oxytoca* и *K. pneumoniae*. Изоляты *E. coli* проявляли высокую АА в отношении бактерий

K. oxytoca значительно чаще, чем при взаимодействии со штаммами *K. pneumoniae*, различия статистически достоверные ($\chi^2 = 7,113$; $p = 0,008$).

Изоляты *E. coli* (13), обладающие высоким уровнем АА, были изучены молекулярно-генетическими методами. Молекулярное серотипирование по О- и Н-антигенам в 60% случаев выявило наличие генов энтеротоксигенных (O6:H1, O6:H5, O6:H31, O8:H30, O25:H4), энтероинвазивных (O144:H45) и внекишечных патогенных (O1:H7, O2:H6) *E. coli*. Мультилокусное сиквенс-типирование по семи локусам (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) этих штаммов установило, что только два штамма относились к сиквенс-типу ST10 одного клонального комплекса; у 5 штаммов принадлежность к клональному комплексу не определялась. Таким образом, по сиквенс-типам штаммы характеризовались гетерогенностью.

Результаты полногеномного секвенирования штаммов *E. coli*, изолированных от пациентов с описторхозной инвазией, свидетельствовали о наличии у них 25 комплексов генов, ассоциированных с вирулентностью: адгезинов — *pic*, *sfaS*, *iha*, *lpfA*; инвазинов — *mchF*, *iroN*, *ireA*; токсинов — *astA*, *cnf1*, *vat*, *sat*, *senB*, *eilA*, *sigA*; бактериоцинов — *mchB*, *mchC*, *mcmA*, *cba*, *cma*, *selB*. Практически у всех штаммов (80%) обнаружен ген increased serum survival (*iss*) — ген повышенной выживаемости в сыворотке крови, а также ген glutamate decarboxylase (*gad*) — фермент, катализирующий процесс декарбоксилирования в микробной клетке. Два штамма, обладающие максимально высоким показателем ИАА, являлись носителями наибольшего ко-

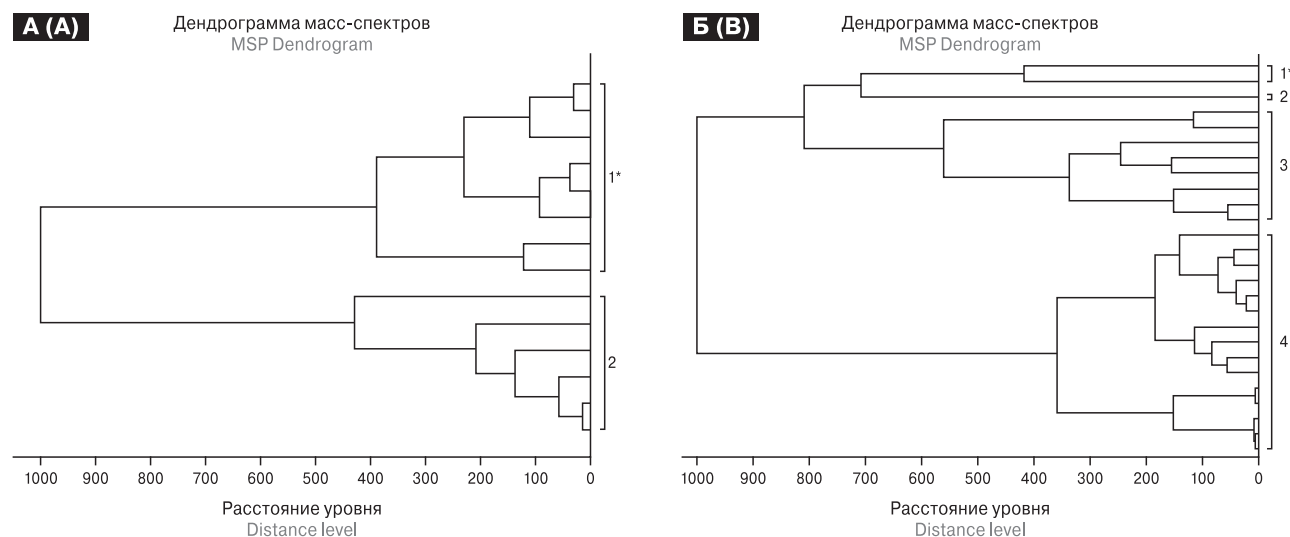


Рисунок 3. Дендрограммы штаммов *E. coli*, обладающих низким показателем ИАА ≤ 20 (А) и высоким — ИАА > 70 (Б)

Figure 3. Dendrograms of *E. coli* strains with low IAA ≤ 20 (A) and high — IAA > 70 (B)

Примечание. *Цифрами обозначены отдельные кластеры *E. coli*.

Note. *Numbers indicate separate *E. coli* clusters.

личества комплексов генов вирулентности (48% и 36%): адгезинов (*pic*, *sfaS*, *iha*); инвазинов (*mchF*, *iroN*); токсинов (*astA*, *crf1*, *vat*, *sat*) и бактериоцинов (*mchB*, *mchC*, *mcmA*), и относились к энтеротоксигенным *E. coli* сиквенс-серотипам O6:H1 и O6:H5.

Сиквенс-серотипирование штаммов *K. pneumoniae*, выявило отличие их по O- и капсульному (KL) антигенам: KL2:O1v2; KL1:O1v2; KL47:O1v1; KL139:O1v1; KL125:O5. Мультилокусное сиквенс-типирование (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*) установило принадлежность к разным сиквенс типам. Для всех штаммов была характерна гомология маркеров антибиотикорезистентности *oqxA*, *oqxB* (chloramphenicol, benzylkonium chloride, cetylpyridinium chloride, nalidixic acid, ciprofloxacin, trimethoprim) и *fosA* (fosfomycin) и разнообразие вариантов генов резистентности к бета-лактамам антибиотикам.

Сиквенс-типы бактерий *K. oxytoca* определены как ST242 (два штамма) и ST176. По маркерам резистентности к различным группам антимикробных препаратов один штамм в геноме имел максимальный набор (*oqxA*, *oqxB*, *qnrB1*, *fosA*, *fosA3*, *rmtB*, *dfrA14*, *tet(A)*, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{SHV-106}, *bla*_{TEM-214}, *bla*_{TEM-209}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{SHV-28}, *bla*_{TEM-206}, *bla*_{TEM-1B}, *bla*_{TEM-141}); у двух других выявлены гены только группы *bla*_{OXY-2-5}, *bla*_{OXY-5-1}, *bla*_{OXY-5-2}.

Таким образом, изоляты *E. coli*, выделенные из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом «Описторхоз» показали, что в их структуре преобладали культуры ферментирующие лактозу, обладающие подвижностью и не проявляющие гемолитическую активность. Установлено, что изоляты этой группы проявляли высокую антагонистическую активность в отношении бактерий рода *Klebsiella* и характеризовались носительством генов сиквенс-серотипов по O- и H-антигенам энтеротоксигенных, энтероинвазивных и внекишечных патогенных *E. coli*. Кроме того, они являлись носителями генов, ассоциированных с вирулентностью.

Обсуждение

Микробиота играет существенную роль в жизнедеятельности организма. Одна из основных ее функций — формирование барьера колонизационной резистентности, предотвращающая контаминацию слизистых оболочек патогенами путем проявления антагонистической активности автохтонной микробиоты [7, 14]. Иммунологический статус макроорганизма обеспечивает оптимальные для конкретных ситуаций симбиотические и антагонистические отношения микроорганизмов, способствующие формированию новых фенотипических и генотипических свойств [9]. Так называемый «микробный орган» характеризуется феноти-

пической гетерогенностью, генетической разнородностью и сложными скоординированными связями. Факторы, определяющие структуру микробных сообществ и их антагонистические взаимодействия в кишечнике, еще мало изучены [1, 16].

Типичными представителями микробиоты млекопитающих являются *E. coli*, характеризующиеся широким спектром ферментативной активности, подвижности, биопленкообразования, участием в горизонтальном переносе генетической информации [5]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что изоляты *E. coli*, выделенные из фекалий пациентов с диагнозом «Описторхоз» обладали преимущественно типичными фенотипическими свойствами, но при этом являлись носителями комплексов генов вирулентности. Почти половина изученных нами изолятов обладали генами, ответственными за продукцию бактериоцинов. Известно, что гены системы продукции бактериоцинов, являются важными факторами колонизационной резистентности кишечника и связаны с их пробиотическими свойствами [14]. Антимикробная активность бактериоцинов, обуславливающая антагонизм между бактериями, направлена не только на штаммы филогенетически родственных видов бактерий, но и других видов и родов. Решение проблемы резистентности к антибиотикам бактерий инициирует интерес к естественным альтернативам — колицинам и микроцинам, продуцируемым *E. coli* [18, 19]. В 80% случаев штаммы *E. coli*, изолированные от пациентов с описторхозной инвазией, являлись носителями гена *glutamate decarboxylase (gad)* — фермента, катализирующего необратимое декарбоксилирование l-глутаминовой кислоты, участвующей в выполнении различных физиологических функций [21, 22].

В кишечной микробиоте человека при описторхозной инвазии наиболее часто встречаются бактерии *K. pneumoniae*, которые могут быть представлены как комменсальными, так и высокопатогенными штаммами с гипермукоидным фенотипом. Генетические детерминанты патогенного потенциала этих штаммов (гены вирулентности, связанные с адгезией и мукоидным фенотипом) значительно чаще выявляются при воспалительных заболеваниях кишечника [11]. Наибольшую опасность представляют случаи, связанные с гипервирулентными штаммами, способными одновременно продуцировать и бета-лактамазы расширенного спектра действия. Сочетание вирулентности и множественной лекарственной резистентности представляет высокий риск развития бактериальной инфекции [13, 17]. Результаты проведенных исследований изолятов *K. pneumoniae*

выявили наличие в их геномах факторов вирулентности — капсульных антигенов. Несмотря на это, некоторые штаммы *E. coli*, обладающие антагонистической активностью, подавляли рост вирулентных штаммов *K. pneumoniae*.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что антагонистическая активность штаммов *E. coli* с типичными фенотипическими признаками является одним из важных факторов колонизационной резистентности биотопа организма человека от патогенов при инфекционном заболевании. Установлено, что геномы типичных представителей нормобиоты кишечника (*E. coli*) при описторхозной инвазии содержат комплексы генов вирулентности и патогенности. Возможно, эти характеристики обеспе-

чивают высокий уровень их антагонистической активности в отношении *Klebsiella* spp.

Результаты исследований позволили определить штаммы, отличающиеся выраженными антагонистическими свойствами, и депонировать их в государственной коллекции. Нуклеотидные последовательности редких штаммов размещены в GenBank NCBI. Результаты исследования генома штаммов *E. coli* положены в основу изобретения, получен патент РФ № 2756794 «Штамм нового генотипа *Escherichia coli* 1654-1 для молекулярно-генетического типирования бактерий рода *Escherichia*».

Понимание молекулярно-биологических особенностей на уровне фенотипических свойств отдельных изолятов даст возможность прогнозирования колонизационной резистентности биотопа и управления инфекционно-инвазивным процессом.

Список литературы/References

1. Андрюков Б.Г., Тимченко Н.Ф., Ляпун И.Н., Бынина М.П., Матосова Е.В. Гетерогенность в изогенных популяциях бактерий и современные технологии клеточного фенотипирования // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2021. Т. 98, № 1. С. 73–83. [Andryukov B.G., Timchenko N.F., Lyapun I.N., Bynina M.P., Matosova E.V. Heterogeneity in isogenic bacteria populations and modern technologies of cell phenotyping. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2021, vol. 98, no. 1, pp. 73–83. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-33
2. Афонюшкин В.Н., Донченко Н.А., Козлова Ю.Н., Давыдова Н.В., Коптев В.Ю., Черепушкина В.С. Роль биопленок в адаптации микроорганизмов к неблагоприятным факторам окружающей среды на примере *Pseudomonas aeruginosa* (обзор литературы) // Гигиена и санитария. 2020. Т. 99, № 4. С. 379–383. [Afonyushkin V.N., Donchenko N.A., Kozlova J.N., Davidova N.A., Koptev V.Yu., Cherepushkina V.S. Questions on the role of biofilms for the adaptation of microorganisms to unfavorable environmental factors by the example of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gigiya i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2020, vol. 99, no. 4, pp. 379–383. (In Russ.)] doi: 10.47470/0016-9900-2020-99-4-379-383
3. Бибик О.И. Описторхоз — актуальная проблема здравоохранения (обзор и анализ проблемы) // Российский паразитологический журнал. 2020. Т. 14, № 4. С. 38–49. [Bibik O.I. Opisthorchosis is a topical health problem (problem overview and analysis). *Rossiiskii parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology*, 2020, vol. 14, no. 4, pp. 38–49. (In Russ.)] doi: 10.31016/1998-8435-2020-14-4-38-49
4. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Роль микробиоты в регуляции гомеостаза организма человека при инфекции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2020. Т. 97, № 5. С. 458–467. [Bukharin O.V., Perunova N.B. The role of microbiota in the regulation of homeostasis in the human body during infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2020, vol. 97, no. 5, pp. 458–467. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-5-8
5. Годовалова А.П., Ожгибесов Г.П., Никулина Е.А. Особенности штаммов *Escherichia coli*, выделенных при воспалительных заболеваниях // Вестник современной клинической медицины. 2019. Т. 12, № 4. С. 7–10. [Godovalov A.P., Ozhgibesov G.P., Nikulina E.A. The properties of *Escherichia coli* strains isolated in human inflammatory diseases. *Vestnik sovremennoi klinicheskoi meditsiny = The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*, 2019, vol. 12, no. 4, pp. 7–10. (In Russ.)] doi: 10.20969/VSKM.2019.12(4).7-10
6. Дружинин В.Г., Буслаев В.Ю., Баранова Е.Д., Начева Л.В. Роль микробиоты в поддержании гомеостаза и индукции мутагенеза в соматических клетках человека // Фундаментальная и клиническая медицина. 2018. Т. 3, № 4. С. 83–92. [Druzhinin V.G., Buslaev V.Y., Baranova E.D., Nacheva L.V. The role of microbiota in cellular homeostasis and mutagenesis. *Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina = Fundamental and Clinical Medicine*, 2018, vol. 3, no. 4, pp. 83–92. (In Russ.)] doi: 10.23946/2500-0764-2018-3-4-83-92
7. Заславская М.И., Махрова Т.В., Александрова Н.А., Игнатова Н.И., Белова И.В., Точилина А.Г., Соловьева И.В. Перспективы использования бактериоцинов нормальной микробиоты в антибактериальной терапии (обзор) // Современные технологии в медицине. 2019. Т. 11, вып. 3. С. 136–145. [Zaslavskaya M.I., Makhrova T.V., Aleksandrova N.A., Ignatova N.I., Belova I.V., Tochilina A.G., Solovyeva I.V. Prospects for using bacteriocins of normal microbiota in antibacterial therapy (review). *Sovremennye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2019, vol. 11, no. 3, pp. 136–145. (In Russ.)] doi: 10.17691/stm2019.11.3.17
8. Захаренко С.М. Токсин-продуцирующие *Klebsiella oxytoca* как причина антибиотик-ассоциированного колита // Альманах клинической медицины. 2018. Т. 46, № 5. С. 497–503. [Zakharenko S.M. Toxin-producing *Klebsiella oxytoca* as a cause of antibiotic-associated colitis. *Al'manakh klinicheskoi meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2018, vol. 46, no. 5, pp. 497–503. (In Russ.)] doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-5-497-503

9. Караулов А.В., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Бондаренко Н.Л., Воропаева Е.А., Афанасьев М.С., Несвижский Ю.В., Алешкин А.В., Борисова О.Ю., Овсянникова Е.Г., Рубальский О.В., Пылев А.Л., Бочкарева С.С., Сердюков В.Г., Рубальская Е.Е., Воропаев А.Д., Махмудов Р.С. Механизмы приобретения вирулентности условно-патогенными микроорганизмами и формирования пула нозокомиальных штаммов в микробиоценозах слизистых открытых полостей организма // Астраханский медицинский журнал. 2018. Т. 13, № 2. С. 17–31. [Karaulov A.V., Afanas'ev S.S., Aleshkin V.A., Bondarenko N.L., Voropaeva E.A., Afanas'ev M.S., Nesvizhskii Yu.V., Aleshkin A.V., Borisova O.Yu., Ovsyannikova E.G., Rubal'skii O.V., Pylev A.L., Bochkareva S.S., Serdyukov V.G., Rubal'skaya E.E., Voropaev A.D., Makhmudov R.S. Mechanisms of virulence acquisition of opportunistic microorganisms and nosocomial strains pool formation in mucosal microbiocenoses of open cavities of the body. *Astrakhanskii meditsinskii zhurnal = Astrakhan Medical Journal*, 2018, vol. 13, no. 2, pp. 17–31. (In Russ.) doi: 10.17021/2018.13.2.17.31
10. Лазарева И.В., Старкова П.С., Агеев В.А., Волкова М.О., Лебедева М.С., Навацкая А.С., Мясникова Е.Б., Митрошина Г.В., Сидоренко С.В. Оценка распространения ректального носительства генов вирулентности и карбапенемаз у пациентов, поступивших на плановую госпитализацию // Антибиотики и химиотерапия. 2018. Т. 63, № 11–12. С. 18–23. [Lazareva I.V., Starkova P.S., Ageevets V.A., Volkova M.O., Lebedeva M.S., Navatskaya A.S., Myasnikova E.B., Mitroshina G.V., Sidorenko S.V. Assessment of the distribution of rectal carriage of virulence and carbapenemases genes in patients enrolled for planned hospitalization. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2018, vol. 63, no. 11–12, pp. 18–23. (In Russ.)]
11. Пай Г.В., Ракитина Д.В., Сухина М.А., Юдин С.М., Макаров В.В., Мания Т.Р., Загайнова А.В. Оценка наличия генов, связанных с вирулентностью, у изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из микробиоты больных и «практически» здоровых людей, с применением метода мультиплексной полимеразной цепной реакции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022. Т. 99, № 4. С. 436–444. [Pay G.V., Rakitina D.V., Sukhina M.A., Yudin S.M., Makarov V.V., Maniya T.R., Zagaaynova A.V. Multiplex PCR screening for virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* isolated from microbiota of diseased and healthy people. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2022, vol. 99, no. 4, pp. 436–444. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-237
12. Семенов А.В. Антагонизм как результат межмикробных отношений // Бюллетень оренбургского научного центра УРО РАН. 2013. № 1: 8. [Semenov A.V. Antagonism as a result cross-species interaction between microorganisms. *Bulleten' orenburgskogo nauchnogo tsentra URO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2013, no. 1: 8. (In Russ.) URL: [http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2013-1/Articles/SemenovAV\(2013-1\).pdf](http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2013-1/Articles/SemenovAV(2013-1).pdf) (05.06.2023)
13. Семенова Д.Р., Николаева И.В., Фиалкина С.В., Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Валиуллина И.Р. Частота колонизации «гипервирулентными» штаммами *Klebsiella pneumoniae* новорожденных и грудных детей с внебольничной и нозокомиальной клебсиеллезной инфекцией // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2020. Т. 65, № 5. С. 158–163. [Semenova D.R., Nikolaeva I.V., Fialkina S.V., Khaertynov Kh.S., Anohin V.A., Valiullina I.R. Frequency of colonization with “hypervirulent” *Klebsiella pneumoniae* strains of newborns and infants with community-acquired and nosocomial klebsiella infection. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2020, vol. 65, no. 5, pp. 158–163. (In Russ.) doi: 10.21508/1027-4065-2020-65-5-158-163
14. Синягина М.Н., Лайков А.В., Маркелова М.И., Булыгина Е.А., Хуснутдинова Д.Р., Абдулхаков С.Р., Григорьева Т.В. Физиолого-биохимическая и генетическая характеристика конкурентных свойств штаммов *Escherichia coli* в кишечной микрофлоре пациентов с болезнью Крона и здоровых добровольцев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022. Т. 99, № 6. С. 669–681. [Siniagina M.N., Laikov A.V., Markelova M.I., Boulygina E.A., Khusnutdinova D.R., Abdulkhakov S.R., Grigoryeva T.V. Competitive ability of *Escherichia coli* strains in the intestinal microbiota of patients with Crohn's disease and healthy volunteers: physiological, biochemical and genetic characteristics. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2022, vol. 99, no. 6, pp. 669–681. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-192
15. Степанова К.Б., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф., Колотова О.Н. Молекулярно-генетическая характеристика представителей микропаразитоценоза при описторхозе // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2022. № 1. С. 3–10. [Stepanova K.B., Kataeva L.V., Stepanova T.F., Kolotova O.N. Molecular-genetic characteristics of microparasitocenosis members in opisthorchiasis. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2022, vol. 1, pp. 3–10. (In Russ.) doi: 10.33092/0025-8326mp2022.1.3-10
16. Топол И.А., Полякова И.С., Елыкова А.В. Роль кишечной микробиоты в регуляции иммунных реакций в иммунной системе кишечника в условиях стресса и при модуляции ее состава путем введения антибиотиков и пробиотиков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022. Т. 99, № 6. С. 722–733. [Topol I.A., Polyakova I.S., Elykova A.V. Role of intestinal microbiota in regulation of immune reactions of gut-associated lymphoid tissue under stress and following the modulation of its composition by antibiotics and probiotics administration. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2022, vol. 99, no. 6, pp. 722–733. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-270
17. Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Ризванов А.А., Давидюк Ю.Н., Халиуллина С.В., Любин С.А., Казакова Ф.М., Сатрутдинов М.А., Фаттахов М.Г. Вирулентность и антибиотикорезистентность изолятов *Klebsiella pneumoniae* у новорожденных локализованными и генерализованными формами клебсиеллезной инфекции // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2018. Т. 63, № 5. С. 139–146. [Khaertynov K.S., Anohin V.A., Rizvanov A.A., Davidyuk Yu.N., Khaliullina S.V., Lyubin S.A., Kazakova F.M., Satrutdinov M.A., Fattahov M.G. Virulence and antibiotic resistance of isolates of *Klebsiella pneumoniae* in newborns with localized and generalized forms of infection. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2018, vol. 63, no. 5, pp. 139–146. (In Russ.) doi: 10.21508/1027-4065-2018-63-5-139-146
18. Baquero F., Lanza V.F., Baquero M.R., Del Campo R., Bravo-Vázquez D.A. Microcins in Enterobacteriaceae: peptide antimicrobials in the eco-active intestinal chemosphere. *Front. Microbiol.*, 2019, vol. 10: 2261. doi: 10.3389/fmicb.2019.02261
19. Marković K.G., Grujović M.Ž., Koračević M.G., Nikodijević D.D., Milutinović M.G., Semedo-Lemsaddek T., Djilas M.D. Colicins and microcins produced by Enterobacteriaceae: characterization, mode of action, and putative applications. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 2022, vol. 19, no. 18: 11825. doi: 10.3390/ijerph191811825

20. Pakharukova M.Y., Lishai E.A., Zapparina O., Baginskaya N.V., Hong S.J., Sripa B., Mordvinov V.A. Opisthorchis viverrini, Clonorchis sinensis and Opisthorchis felinus affect mammalian host microbiome in a species-specific manner. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2023, vol. 17, no. 2: e0011111. doi: 10.1371/journal.pntd.0011111
21. Sun L., Bai Y., Zhang X., Zhou C., Zhang J., Su X., Luo H., Yao B., Wang Y., Tu T. Characterization of three glutamate decarboxylases from *Bacillus* spp. for efficient γ -aminobutyric acid production. *Microb. Cell Fact.*, 2021, vol. 20, no. 1: 153. doi: 10.1186/s12934-021-01646-8
22. Yogeswara I.B.A., Maneerat S., Haltrich D. Glutamate decarboxylase from lactic acid bacteria — a key enzyme in GABA Synthesis. *Microorganisms*, 2020, vol. 8, no. 12: 1923. doi: 10.3390/microorganisms8121923

Авторы:

Катаева Л.В., д.м.н., главный научный сотрудник, зав. бактериологической лабораторией ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Карпухина Н.Ф., биолог бактериологической лаборатории ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Вакарина А.А., к.м.н., старший научный сотрудник бактериологической лаборатории ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Колотова О.Н., младший научный сотрудник бактериологической лаборатории ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Степанова Т.Ф., д.м.н., профессор, директор ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Степанова К.Б., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клиники и иммунологии биогельминтозов ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия.

Authors:

Kataeva L.V., DSc (Medicine), Head Researcher, Head of the Bacteriological Laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Karpukhina N.F., Biologist, Bacteriological Laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Vakarina A. A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Bacteriological Laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Kolotova O.N., Junior Researcher, Bacteriological Laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Stepanova T.F., DSc (Medicine), Professor, Director of Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Stepanova K.B., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Clinics and Immunology of Biohelminthiasis, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation.

Поступила в редакцию 09.06.2023
Принята к печати 02.12.2023

Received 09.06.2023
Accepted 02.12.2023

ОСОБЕННОСТИ БАЗАЛЬНОЙ И ЛИПОПОЛИСАХАРИД-ИНДУЦИРОВАННОЙ СЕКРЕЦИИ ЦИТОКИНОВ В КУЛЬТУРАХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ЭРИТЕМНОЙ ФОРМОЙ ОСТРОГО ИКСОДОВОГО КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИНИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

Е.Н. Ильинских, О.В. Воронкова, Р.Р. Хасанова, К.В. Самойлов, А.В. Семенова, И.Е. Есимова, Е.А. Мотлохова, О.В. Ямпольская, А.В. Ямпольская

ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия

Резюме. Введение. В настоящее время остаются малоизученными особенности продукции цитокинов в культурах мононуклеарных клеток больных иксодовым клещевым боррелиозом в зависимости от клинических данных. Целью исследования являлось изучение особенностей базальной и липополисахарид-индуцированной цитокин-секреторной активности мононуклеарных лейкоцитов периферической крови больных с острым течением эритемной формы иксодового клещевого боррелиоза в зависимости от клинических параметров. *Материалы и методы.* Группы из 22 и 12 больных с диагнозами легкой или средней степени тяжести изолированной и смешанной с клещевым энцефалитом эритемной формы иксодового клещевого боррелиоза были обследованы дважды — в первую неделю болезни и в динамике через 14 дней после терапии. Контрольная группа включала 17 здоровых доноров. С помощью иммуноферментного анализа в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов были исследованы базальные и липополисахарид-индуцированные уровни продукции интерлейкинов (IL)-6, IL-10 и фактора некроза опухоли (TNF)- α . Для статистического анализа использовали U-критерии Манна–Уитни, критерий Вилкоксона и ранговую корреляцию Спирмена. *Результаты.* Группа пациентов со среднетяжелым течением боррелиоза клинически отличалась более выраженными проявлениями лихорадочно-интоксикационного синдрома. В клеточных культурах больных боррелиозом со среднетяжелым течением в начале заболевания уровни базальной секреции TNF α , IL-6 и IL-10 были существенно повышены как по сравнению с пациентами с легким течением, так и со здоровыми донорами. В динамике после антибиотикотерапии уровни спонтанной секреции TNF α и IL-10 имели тенденцию к снижению. В первую неделю болезни добавление липополисахарида в культуры клеток больных со среднетяжелым течением приводило к значительному подавлению продукции

Адрес для переписки:

Ильинских Екатерина Николаевна
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2,
ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский
университет Минздрава России.
Тел.: 8 (3822) 41-98-28. E-mail: infconf2009@mail.ru

Contacts:

Ekaterina N. Ilyinskikh
634050, Russian Federation, Tomsk, Moskovsky trakt, 2,
Siberian State Medical University.
Phone: +7 (3822) 41-98-28. E-mail: infconf2009@mail.ru

Для цитирования:

Ильинских Е.Н., Воронкова О.В., Хасанова Р.Р., Самойлов К.В., Семенова А.В., Есимова И.Е., Мотлохова Е.А., Ямпольская О.В., Ямпольская А.В. Особенности базальной и липополисахарид-индуцированной секреции цитокинов в культурах мононуклеарных лейкоцитов крови больных с эритемной формой острого иксодового клещевого боррелиоза в зависимости от клинических параметров // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1058–1068. doi: 10.15789/2220-7619-FOB-17538

Citation:

Ilyinskikh E.N., Voronkova O.V., Hasanova R.R., Samoylov K.V., Semenova A.V., Esimova I.E., Motlokhova E.A., Yampolskaya O.V., Yampolskaya A.V. Features of baseline and lipopolysaccharide-induced cytokine secretion in mononuclear leukocyte cultures from patients with the erythema migrans form of acute lyme borreliosis based on clinical parameters // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1058–1068. doi: 10.15789/2220-7619-FOB-17538

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-20010 и средств Администрации Томской области.
The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 22-15-20010 and the Tomsk Region Administration.

TNF α и повышению секреции IL-10, как по сравнению с пациентами с легким течением, так и со здоровыми донорами. Липополисахарид-индуцированная секреция IL-6 в супернатантах культур этих больных была существенно ниже, чем у пациентов с легким течением. В динамике уровень индуцированной продукции TNF α у больных со среднетяжелым течением повышался, превосходя значения в контрольной группе. У больных выявлены прямые корреляционные зависимости между базальной секрецией IL-6 и TNF α в клеточных культурах и максимальной температурой тела или концентрацией С-реактивного белка в сыворотке крови. Уровни концентрации TNF α в пробах с липополисахаридом имели обратные зависимости от высоты лихорадки или от уровней секреции IL-10. **Выводы.** Показано, что уровни базальной секреции TNF α , IL-6 и IL-10 в клеточных культурах больных острым иксодовым клещевым боррелиозом повышались с увеличением тяжести течения заболевания. Подавление липополисахарид-индуцированной продукции TNF α в культурах клеток больных со среднетяжелым течением возможно связано с эффектами регуляторного цитокина IL-10.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, эритемная форма, цитокины, липополисахарид, культура клеток крови, мононуклеарные лейкоциты, клиническое течение.

FEATURES OF BASELINE AND LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED CYTOKINE SECRETION IN MONONUCLEAR LEUKOCYTE CULTURES FROM PATIENTS WITH THE ERYTHEMA MIGRANS FORM OF ACUTE LYME BORRELIOSIS BASED ON CLINICAL PARAMETERS

Pyinskikh E.N., Voronkova O.V., Hasanova R.R., Samoylov K.V., Semenova A.V., Esimova I.E., Motlokhova E.A., Yampolskaya O.V., Yampolskaya A.V.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Introduction. Features of cytokine production in mononuclear cell cultures from Lyme borreliosis patients based on clinical data remained poorly studied. The study aim was to estimate the patterns of baseline and lipopolysaccharide-induced cytokine-secretory activity of peripheral blood mononuclear leukocytes from patients with erythema migrans form of acute Lyme borreliosis based on clinical parameters. **Materials and methods.** Groups of 22 and 12 patients with the diagnoses of mild or moderate severity of monoinfection and co-infection with tick-borne encephalitis of Lyme borreliosis with erythema migrans were examined twice: on week 1 after disease onset and day 14. The control group included 17 healthy donors. Basal and lipopolysaccharide-induced IL-6, IL-10, and TNF α secretion levels were assessed in mononuclear leukocyte culture supernatants applying enzyme immunoassay. Statistical analysis was performed by using the Mann–Whitney U-test, Wilcoxon test, and Spearman's rank correlation. **Results.** The group of moderate severity patients was clinically distinguished by severer fever and intoxication manifestations. At the disease onset, the basal TNF α , IL-6 and IL-10 secretion levels in the moderate severity patient cultures were significantly higher than in those of the other groups. After antibiotics treatment, the baseline TNF α and IL-10 levels tended to decrease. At the onset, lipopolysaccharide-induced cultures from the moderate severity patients showed significantly suppressed TNF α production and increased IL-10 secretion as compared to the other groups. Lipopolysaccharide-induced IL-6 secretion in the moderate vs. mild severity group supernatants was significantly lower. In dynamics, the induced TNF α levels in the moderate severity patients were increased to the magnitude exceeding that in the controls. Positive correlations between the IL-6 and TNF α basal levels and maximum body temperature or the C-reactive protein serum concentrations were revealed in the patients. Induced TNF α levels showed negative correlations with fever levels or with IL-10 secretion. **Conclusions.** It was demonstrated that basal TNF α , IL-6 and IL-10 secretion levels in the mononuclear cell cultures of acute Lyme borreliosis patients increased with the increasing disease severity. Suppression of lipopolysaccharide-induced TNF α production in the moderate severity patient cultures was presumably associated with the regulatory cytokine IL-10 effects.

Key words: Lyme borreliosis, erythema migrans form, cytokines, lipopolysaccharide, blood culture, mononuclear leukocytes, clinical course.

Введение

Известно, что иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) являются наиболее распространенными в России природно-очаговыми инфекциями с трансмиссивным механизмом передачи [8]. Хотя особенности цитокинового статуса у больных ИКБ исследуются достаточно давно, по-прежнему практически отсутствуют работы, связанные с анализом закономерностей базальной и стимулированной секреции цитокинов иммунокомпетентными клетками в условиях *in vitro*, в осо-

бенности в зависимости от клинических форм и тяжести течения заболевания [1]. Многие исследователи предполагают, что особенности врожденного иммунного ответа, направленного против боррелий, имеют существенное значение для клинического течения ИКБ в острый период заболевания, включая риск диссеминации спирохет из первичного очага в кожу во внутренние органы и нервную систему [2, 11, 17]. Как известно факторы врожденного иммунитета способствуют раннему сдерживанию распространения патогена, благодаря быстрой неспецифической воспали-

тельной реакции с участием моноцитов/макрофагов и других антигенпрезентирующих клеток (АПК) [11, 17]. Для моделирования в условиях *in vitro* пролиферации мононуклеарных клеток и продукции ими цитокинов клеточные культуры стимулируют неспецифическими поликлональными митогенами растительного или бактериального происхождения, одним из которых является липополисахарид (ЛПС). ЛПС представляет собой эндотоксин и является основным компонентом внешней мембраны грамотрицательных бактерий, стимулирующим, прежде всего, реакции врожденного иммунитета [5]. Показано, что при введении ЛПС в организме экспериментальных животных развиваются реакции острой фазы, включающие лихорадку, обусловленную пирогенными эффектами как самого ЛПС, так и провоспалительными цитокинами врожденного иммунного ответа — фактора некроза опухоли (TNF)- α , а также интерлейкинов (IL)-1 β и IL-6 [5, 14]. Кроме того, ЛПС обладает свойствами тимус-независимого антигена, поскольку он способен вызывать поликлональную активацию В-лимфоцитов и антителообразование в отсутствие хелперных клонов Т-лимфоцитов [5].

Стимуляция ЛПС первичных культур лейкоцитов периферической крови применяется для оценки в условиях *in vitro* состоятельности и напряженности факторов преимущественно врожденного иммунного ответа, а также для изучения поликлональной неспецифической пролиферации В-клеток при различных остро-воспалительных, аутоиммунных и инфекционных заболеваниях [5, 15, 24].

Целью исследования являлось изучение особенностей базальной и ЛПС-индуцированной цитокин-секреторной активности мононуклеарных лейкоцитов периферической крови больных с острым течением эритемной формы (ЭФ) ИКБ в зависимости от клинических параметров.

Материалы и методы

В исследование было включено 34 пациента, имевших диагноз острого течения моноинфекции ЭФ ИКБ или микст-инфекции ЭФ ИКБ с лихорадочной формой клещевого энцефалита (КЭ), госпитализированных в инфекционную клинику Сибирского государственного медицинского университета (СибГМУ) Минздрава России в первую неделю от начала заболевания.

В исследование включены 22 больных с моно- и микст-инфекцией ЭФ ИКБ с легкой степенью тяжести заболевания, и 12 пациентов со среднетяжелым течением болезни. Из обследованных пациентов 19 (55,88%) были мужчины и 15 (44,12%) — женщины, средний возраст которых составил $43,41 \pm 1,89$ и $48,12 \pm 1,63$ лет со-

ответственно. Для сравнения изученных параметров была обследована контрольная группа из 17 условно-здоровых добровольцев, сопоставимых с основной группой по полу и возрасту, которые не болели инфекциями, передающимися иксодовыми клещами, и имели отрицательные результаты лабораторных тестов на наличие данных заболеваний. Контрольная группа состояла из 9 (52,94%) мужчин и 8 (47,06%) женщин, средний возраст которых составил $44,44 \pm 2,39$ и $44,75 \pm 3,16$ лет соответственно.

Диагноз ЭФ острого ИКБ был поставлен в соответствии с классификацией Ю.В. Лобзина с соавт. [4]. Критериями легкого течения ИКБ являются слабая выраженность симптомов интоксикации и температура тела, не превышающая $38,0^{\circ}\text{C}$, продолжительностью до 3 дней, а для среднетяжелого течения характерны умеренные признаки интоксикации и лихорадка от $38,1$ до $39,1^{\circ}\text{C}$ [4].

Все участники настоящего исследования, проведение которого было одобрено этическим комитетом СибГМУ Минздрава России (протоколы № 9119/1 от 30.05.2022 г. и № 9349 от 23.01.2023 г.), дали письменные добровольные информированные согласия.

Критериями включения в исследование для больных ИКБ являлись поступление в стационар в срок не позднее 7 дня от начала заболевания, наличие патогномичного симптома — мигрирующей эритемы на месте присасывания клеща, клинико-эпидемиологическое и лабораторное подтверждение диагноза острого течения моноинфекции ЭФ ИКБ или микст-инфекции ЭФ ИКБ с КЭ, возраст от 20 до 55 лет, наличие информированного согласия на участие в исследовании. Критериями исключения для больных ИКБ и контрольной группы были беременность, лактация, отказ от участия в исследовании, наличие фоновой декомпенсированной соматической патологии или хронических инфекционных заболеваний (ВИЧ-инфекция, туберкулез и др.), а также вакцинаций, острых воспалительных и инфекционных заболеваний в срок менее двух месяцев до начала исследования.

Все больные ИКБ находились в стационаре под наблюдением опытных клиницистов, получили курс антибиотикотерапии (цефтриаксон) в соответствии со стандартными схемами. Клиническое обследование включало анализ 25 клинико-anamnestических и лабораторных параметров, в том числе данных о проявлениях синдромов лихорадки и интоксикации при поступлении пациента в стационар. Общий срок наблюдения за пациентами в амбулаторных условиях составил 12 мес.

Лабораторное подтверждение диагноза ИКБ проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на основании

определения коэффициентов позитивности (КП) в динамике в день поступления пациента в стационар, на 14 и 21 день, а также через 3 и 6 мес. Все больные ЭФ ИКБ, включенные в исследование, имели положительные результаты обнаружения специфических иммуноглобулинов (Ig) классов М и G к *Borrelia burgdorferi s. l.* Подтверждение микст-инфекции проводилось на основании определения IgM и IgG к вирусу клещевого энцефалита и его антигена с использованием тест-систем АО «Вектор-Бест» (Россия). Эти же методы были применены для исключения лиц, серопозитивных по клещевым инфекциям, при формировании контрольной группы. Дополнительно в группе больных ИКБ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) были исключены: возвратная клещевая лихорадка, вызываемая *Borrelia miyamotoi*, риккетсиозы (*Rickettsia sibirica*, *Rickettsia heilongjiangensis*), а также гранулоцитарный анаплазмоз человека и эрлихиозы (*Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis*) с использованием наборов серии «РеалБест» (АО «Вектор-Бест», Россия).

Материалом для исследования была периферическая венозная кровь, взятая натощак в вакуумные пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта. У больных ЭФ ИКБ кровь бралась двукратно: в первую неделю заболевания при госпитализации пациента до начала курса антибиотикотерапии и повторно в динамике через 14 дней после лечения. Для получения культур мононуклеарных лейкоцитов пробы крови центрифугировали в градиенте плотности фикола (ООО «БиолоТ», Россия). Выделенные мононуклеарные клетки, сначала трижды отмывали и ресуспендировали, а затем культивировали в полной питательной среде на основе RPMI-1640 с L-глутамином и добавлением 10% инактивированной стерильной эмбриональной телячьей сыворотки, 10 мг/мл гентамицина, а также 10 мМ НЕРЕС (ООО «БиолоТ», Россия) в CO₂-инкубаторе HF90 (Heal Force, КНР) при 37°C и 5% концентрации CO₂ в течение 24 ч. Жизнеспособность мононуклеаров предварительно оценивали после окрашивания трипановым синим (не менее 95% клеток). Клеточные суспензии разбавляли для получения клеточной концентрации 2×10^6 /мл и культивировали без применения индуктора для изучения уровней базальной продукции цитокинов или с добавлением в качестве индуктора 10 нг/мл раствора бактериального ЛПС *Escherichia coli* (Servicebio, КНР).

Полученные аликвоты культуральных супернатантов хранили при –70°C до проведения анализа. Уровни базальной и ЛПС-индуцированной продукции TNF α , IL-6 и IL-10 определяли методом твердофазного ИФА с использованием наборов реагентов АО «Вектор-Бест» (Россия).

Для статистического анализа использовалась программа STATISTICA 12.0 (StatSoft, США) [3]. В результате проверки данных с помощью критерия Колмогорова–Смирнова было обнаружено, что значения концентрации цитокинов не соответствовали нормальному распределению. Анализ взаимосвязи между парами дискретных качественных признаков проводился с использованием точного критерия Фишера (ТКФ) [7]. Для сравнений количественных показателей в независимых группах и подгруппах применяли непараметрический метод — U-критерий Манна–Уитни [7]. Для статистического анализа параметров в связанных группах в динамике применялся критерий Вилкоксона [7]. Для оценки взаимосвязи между параметрами использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Данные были представлены как медиана (Me) и первый и третий квартили (Q₁; Q₃). Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез было равно 0,05.

Результаты

В табл. 1 приведена характеристика основных клинико-anamnestических параметров больных, имевших изолированную или микст-инфекцию ЭФ острого ИКБ с легкой и средней степенью тяжести течения заболевания.

Для того, чтобы минимизировать возможные межиндивидуальные различия [18], которые могут оказывать влияние на продукцию цитокинов в ответ на ЛПС, группы обследованных больных были сопоставимы по полу и возрасту. Все пациенты госпитализировались в сроки не позднее 7 дней после начала заболевания. Продолжительность инкубационного периода также не имела статистически значимых различий между сравниваемыми группами. У всех обследованных больных диагноз ЭФ ИКБ был подтвержден наличием мигрирующей эритемы диаметром от 5 до 32 см в месте присасывания клеща и положительными результатами качественного метода ИФА на специфические антитела класса IgM к *Borrelia burgdorferi s. l.* в начале заболевания (результаты анализа на антитела класса IgG к боррелиям в начале болезни были отрицательными), а также обнаружением специфических IgM и/или IgG в динамике. У большинства пациентов (у 32 больных или 94,12%) через 14 дней после начала курса антибиотикотерапии антитела класса IgM к *Borrelia burgdorferi s. l.* были отрицательны. Все пациенты были выписаны из стационара с выздоровлением, нормальными результатами общего и биохимического анализов крови. Результаты ИФА на специфические антитела к боррели-

ям в динамике были отрицательны. В течение срока наблюдения ни у одного из пациентов не были выявлены клинические и лабораторные признаки рецидива заболевания.

Вместе с тем обследованные группы пациентов различались по некоторым клиническим и лабораторным параметрам (табл. 2).

Больные с легким и среднетяжелым течением показали существенные различия высоты максимальной температуры тела и продолжительности лихорадки ($p < 0,001$ в обоих случа-

ях). В группе больных ЭФ ИКБ с легким течением субфебрильная лихорадка не превышала $37,6^{\circ}\text{C}$, ее продолжительность составляла от 1 до 3 дней. У 7 из 22 (31,82%) пациентов ЭФ ИКБ с легким течением температура тела оставалась в норме на протяжении всего заболевания. В то же время у всех обследованных пациентов со среднетяжелым течением была выявлена умеренно выраженная фебрильная лихорадка, варьирующая от $38,1$ до $38,9^{\circ}\text{C}$, продолжительностью не менее 4 дней.

Таблица 1. Характеристика групп пациентов с легкой и средней степенью тяжести течения эритемной формы острого иксодового клещевого боррелиоза

Table 1. Characteristics of mild or moderate severity patient groups during acute Lyme borreliosis with erythema migrans

Параметр/Parameter	Больные/Patients		p	
	Легкая степень Mild severity n = 22	Средняя степень Moderate severity n = 12		
Пол, абс. (%) Sex, abs. (%)	Мужской/Male	12(54,55)	7 (58,33)	> 0,05
	Женский/Female	10 (45,45)	5 (41,67)	> 0,05
Возраст, лет Age, years	Мужчины/Men	46,00 (37,00; 49,00)	40,00 (37,00; 50,00)	> 0,05
	Женщины/Women	51,50 (40,00; 55,00)	46,00 (41,00; 53,00)	> 0,05
Срок госпитализации, день болезни/Hospitalization, day of disease	4,50 (4,0; 6,00)	4,00 (3,00; 5,00)	> 0,05	
Инкубационный период, дни/Incubation period, days	10,50 (8,00; 15,00)	14,00 (9,00; 14,00)	> 0,05	

Примечание. p — уровень значимости различий между группами больных с легким и среднетяжелым течением.

Note. p — significance level of differences between groups of the patients with mild and moderate severity.

Таблица 2. Клинические и лабораторные параметры групп пациентов с легкой и средней степенью тяжести течения эритемной формы острого иксодового клещевого боррелиоза

Table 2. Clinical and laboratory parameters of mild and moderate severity patient groups during acute Lyme borreliosis with erythema migrans

Параметр/Parameter	Больные/Patients		p или ТКФ p or FET
	Легкая степень Mild severity n = 22	Средняя степень Moderate severity n = 12	
Максимальная температура тела, $^{\circ}\text{C}$ Maximum body temperature, $^{\circ}\text{C}$	37,30 (36,70; 37,50)	38,40 (38,20; 38,70)	< 0,001
Продолжительность лихорадки, дни Fever duration, days	2,00 (0,0; 2,00)	4,00 (4,00; 5,00)	< 0,001
Число симптомов Number symptoms	2,00 (1,00; 3,00)	5,50 (4,0; 6,50)	< 0,001
Общая слабость, абс. (%) Weakness, abs. (%)	17 (77,27)	10 (83,33)	> 0,05
Озноб, абс. (%) Chills, abs. (%)	0	7 (58,33)	< 0,001
Головная боль, абс. (%) Headache, abs. (%)	13 (59,09)	12 (100,0)	0,013
Головокружение, абс. (%) Dizziness, abs. (%)	1 (4,55)	6 (50,0)	0,004
Тошнота, абс. (%) Nausea, abs. (%)	0	4 (33,33)	0,011
Миалгии, абс. (%) Myalgia, abs. (%)	5 (22,73)	8 (66,67)	0,025
Артралгии, абс. (%) Arthralgia, abs. (%)	4 (18,18)	7 (58,33)	0,026
Жжение на месте эритемы, абс. (%) Burning in the erythema, abs. (%)	2 (9,09)	7 (58,33)	0,004
СРБ, мг/л CRP, mg/l	1,98 (1,12; 3,45)	6,00 (5,00; 7,50)	< 0,001
АЛТ, МЕ/л ALT, IU/l	21,00 (15,0; 34,00)	24,50 (23,00; 31,00)	> 0,05
АСТ, МЕ/л AST, IU/l	14,00 (10,0; 25,00)	21,00 (16,0; 26,00)	> 0,05
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Leukocytes, $\times 10^9/\text{l}$	6,62 (5,80; 7,87)	5,35 (5,25; 6,42)	> 0,05
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	56,45 (51,20; 64,30)	57,70 (51,50; 62,00)	> 0,05
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	26,00 (24,90; 33,80)	28,20 (24,80; 36,00)	> 0,05
Моноциты, % Monocytes, %	10,30 (8,30; 11,30)	9,50 (7,80; 10,90)	> 0,05

Примечание. СРБ — С-реактивный белок; АЛТ и АСТ — аланин и аспартат аминотрансферазы; p — уровень значимости различий при сравнении количественных параметров между группами больных с легким и среднетяжелым течением, U-критерий Манна-Уитни; ТКФ — точный критерий Фишера, который использовался при сравнении качественных.

Note. CRP — C-reactive protein; ALT and AST — alanine and aspartate aminotransferases; p — significance level of differences comparing numerical parameters between groups of patients with mild and moderate severity, Mann-Whitney U-test; FET — Fisher's exact test while comparing categorical parameters between groups of patients with mild and moderate severity.

Кроме того, группы пациентов с легким и среднетяжелым течением ЭФ ИКБ имели существенные различия в общем числе симптомов в начале заболевания ($p < 0,001$), среди которых доминировали проявления лихорадочно-интоксикационного синдрома — озноб, головная боль, головокружение, тошнота, миалгии и артралгии. Вышеперечисленные симптомы, а также ощущение жжения/болезненности в области мигрирующей эритемы значительно чаще были выявлены в группе больных ЭФ ИКБ со среднетяжелым течением.

Из клинико-лабораторных показателей в группах больных ЭФ ИКБ с легким и среднетяжелым течением в начале заболевания были выявлены существенные различия концентраций одного из белков острой фазы — С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови ($p < 0,001$). В частности, установлено, что у больных ЭФ ИКБ с легким течением этот показатель не превышал 4,0 мг/л, в то время как у пациентов со среднетяжелым течением значения СРБ варьировали от 4,0 до 7,9 мг/л, превышая референтную величину концентрации в сыворотке крови (менее 5 мг/л) у большинства больных в этой группе. Вместе с тем активность ферментов — аланин- и аспаратаминотрансфераз (АЛТ и АСТ) в сыворотке крови, а также абсолютное число лейкоцитов, относительное число нейтрофилов (NEUT), лимфоцитов (LYMPH) и моноцитов (MONO) в гемограмме не имели статистически значимых различий между группами пациентов с легким и среднетяжелым течением ($p > 0,05$ во всех случаях).

В результате статистического анализа различий уровней продукции IL-6, TNF α и IL-10 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов периферической крови, полученных в первую неделю заболевания от пациентов с изолированной и микст-инфекцией ЭФ острого ИКБ, было установлено (табл. 3), что уровни базальной секреции всех трех изученных цитокинов в группе пациентов со среднетяжелым течением заболевания были существенно выше по сравнению с соответствующими значениями как у здоровых доноров, так и у больных с легкой степенью тяжести.

Более того, у больных с легким течением заболевания уровни спонтанной продукции провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF α не имели статистически значимых различий с соответствующими значениями у здоровых доноров ($p > 0,05$ в обоих случаях), а уровни концентрации IL-10 в супернатантах клеточных культур этих пациентов были выше, чем в контроле ($p < 0,001$).

Анализ изученных параметров после курса терапии в динамике (через 14 дней) показал, что в культурах мононуклеарных лейкоцитов

больных ЭФ ИКБ средней степени тяжести при повторном исследовании уровни спонтанной продукции TNF α и IL-10 имели тенденцию к значительному снижению ($p = 0,032$ и $p = 0,024$ соответственно), а уровни секреции IL-6 оставались неизменными ($p > 0,05$).

Добавление в культуры мононуклеарных лейкоцитов периферической крови ЛПС приводило к значительному росту секреции IL-6 и IL-10 у пациентов с легким и среднетяжелым течением ЭФ ИКБ в пробах, взятых в начале болезни, по сравнению со значениями соответствующих показателей у здоровых доноров. Уровни индуцированной секреции провоспалительного цитокина — IL-6 в культурах мононуклеарных клеток больных ЭФ ИКБ средней степени тяжести были достоверно ниже, чем у больных с легким течением заболевания, а уровни концентрации регуляторного интерлейкина — IL-10, напротив, оказалась значительно выше, чем у больных с легкой степенью тяжести.

Изучение динамики ЛПС-индуцированной секреции этих цитокинов показало, что через 2 недели после начала этиотропной терапии в культурах обеих групп больных уровни IL-6 статистически значимо не изменялись, а уровни IL-10 существенно снижались только в супернатантах культур, полученных от больных с легким течением заболевания.

Добавление ЛПС в культуры мононуклеарных клеток периферической крови, полученных в начале заболевания от больных ЭФ ИКБ средней степени тяжести, приводило к существенному подавлению продукции другого провоспалительного цитокина — TNF α — как по сравнению с больными легкой формой болезни, так и по сравнению с контрольной группой, что могло свидетельствовать о снижении резервных возможностей мононуклеарных клеток в этой группе больных. Вместе с тем через 2 недели после начала терапии уровни ЛПС-индуцированной продукции TNF α и индексы стимуляции (ИС) этого цитокина в культурах мононуклеарных клеток, полученных от больных со среднетяжелым течением ЭФ ИКБ, значительно повышались в динамике. В то же время в группе больных с легким течением ЭФ ИКБ уровни ЛПС-индуцированной продукции и ИС TNF α в начале болезни были существенно выше, чем в динамике при повторном исследовании после курса терапии. Кроме того, ИС в ответ на ЛПС IL-6, TNF α и IL-10 в культурах, полученных от больных ЭФ ИКБ средней степени тяжести в начале болезни, были существенно снижены, как по сравнению с больными с легкой формой заболевания, так и по сравнению с контрольной группой.

Более того, отрицательная корреляционная связь между уровнями ЛПС-индуцированной продукции IL-10 и TNF α в культурах монону-

клеарных лейкоцитов больных ЭФ ИКБ ($r = -0,64$, $p < 0,001$), возможно, свидетельствует о том, что регуляторный цитокин IL-10 имеет отношение к подавлению ЛПС-индуцированной секреции TNF α .

Корреляционный анализ показал, что уровни базальной секреции IL-6 и TNF α в культу-

рах мононуклеарных лейкоцитов у больных ЭФ острого ИКБ в начале заболевания находились в прямой зависимости от максимальных значений температуры тела ($r = 0,73$ и $r = 0,64$, $p < 0,001$ в обоих случаях). Более того, уровни спонтанной продукции этих провоспалительных цитокинов в культурах больных ЭФ ИКБ

Таблица 3. Результаты оценки базальной и липополисахарид-индуцированной секреции цитокинов в культурах мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с легкой и средней степенью тяжести течения эритемной формы иксодового клещевого боррелиоза в динамике, Me (Q₁; Q₃)

Table 3. Dynamic results after assessing baseline and lipopolysaccharide-induced cytokine secretion in peripheral blood mononuclear cell cultures from patients with mild and moderate acute Lyme borreliosis with erythema migrans, Me (Q₁; Q₃)

Параметр Parameter		Больные/Patients		Здоровые доноры Healthy donors n = 17
		Легкая степень Mild severity n = 22	Средняя степень Moderate severity n = 12	
IL-6	баз. I, пг/мл bas., pg/ml	257,05 (162,00; 296,90)	517,05 (331,80; 572,00) $p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,001$	199,20 (92,20; 331,40)
	баз. II, пг/мл bas., pg/ml	233,00 (106,30; 265,10)	478,90 (258,70; 553,14) $p_1 = 0,004$, $p_2 = 0,021$	
	инд. I, пг/мл ind., pg/ml	569,97 (543,20; 591,17) $p_1 < 0,001$	498,54 (486,98; 587,25) $p_1 = 0,039$, $p_2 = 0,011$	489,40 (475,80; 500,60)
	инд. II, пг/мл ind., pg/ml	555,66 (499,60; 572,81)	527,80 (524,48; 560,93)	
	ИС I ratio	2,20 (1,64; 3,54)	1,09 (0,98; 1,18) $p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,001$	2,50 (1,51; 5,40)
	ИС II ratio	1,65 (0,97; 3,09)	1,26 (0,98; 2,29) $p_1 < 0,001$	
TNF α	баз. I, пг/мл bas., pg/ml	3,95 (1,37; 7,10)	52,60 (29,70; 70,23) $p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,001$	3,29 (2,64; 10,81)
	баз. II, пг/мл bas., pg/ml	3,89 (3,03; 7,49)	15,59 (11,34; 39,25) $p_1 = 0,016$, $p_3 = 0,032$	
	инд. I, пг/мл ind., pg/ml	353,76 (262,04; 661,32) $p_1 = 0,034$	120,90 (112,93; 153,40) $p_1 = 0,022$, $p_2 = 0,001$	312,60 (202,30; 361,70)
	инд. II, пг/мл ind., pg/ml	233,30 (134,30; 532,34) $p_3 = 0,001$	615,96 (243,67; 635,94) $p_1 = 0,030$, $p_2 = 0,025$, $p_3 = 0,002$	
	ИС I ratio	74,20 (21,53; 381,63)	2,32 (1,72; 5,16) $p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,001$	96,21 (30,94; 157,54)
	ИС II ratio	32,25 (12,46; 43,85) $p_1 < 0,001$, $p_3 = 0,021$	24,99 (6,23; 40,78) $p_1 < 0,001$, $p_3 = 0,020$	
IL-10	баз. I, пг/мл bas., pg/ml	33,48 (24,11; 123,00) $p_1 < 0,001$	138,70 (84,16; 181,30) $p_1 < 0,001$, $p_2 = 0,002$	8,89 (3,06; 12,03)
	баз. II, пг/мл bas., pg/ml	20,14 (12,30; 27,00) $p_1 = 0,026$, $p_3 = 0,042$	34,50 (30,63; 67,40) $p_1 = 0,020$, $p_3 = 0,024$	
	инд. I, пг/мл ind., pg/ml	164,90 (126,80; 197,30) $p_1 < 0,001$	272,90 (153,50; 389,60) $p_1 < 0,001$, $p_2 = 0,012$	60,23 (39,02; 108,30)
	инд. II, пг/мл ind., pg/ml	129,70 (81,67; 164,30) $p_1 = 0,041$, $p_3 = 0,002$	210,40 (120,80; 234,35) $p_1 = 0,002$	
	ИС I ratio	4,72 (2,34; 9,14) $p_1 = 0,001$	1,69 (0,99; 1,82) $p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,001$	9,05 (3,71; 25,43)
	ИС II ratio	4,99 (3,64; 21,49)	5,27 (1,17; 7,04) $p_1 < 0,001$, $p_3 = 0,007$	

Примечание. баз. — базальный уровень; инд. — индуцированный липополисахаридом уровень; ИС — индекс стимуляции; I — уровень в начале заболевания; II — уровень в динамике, через 14 дней; p_1 — уровень значимости различий при сравнении с параметрами между больными и здоровыми донорами, U-критерий Манна-Уитни; p_2 — уровень значимости различий при сравнении между группами больных с легким или среднетяжелым течением, U-критерий Манна-Уитни; p_3 — уровень значимости различий при сравнении параметров у больных в динамике в начале болезни и через 14 дней, критерий Вилкоксона.

Note. bas. — a basal level; ind. — a lipopolysaccharide-induced level; ratio — the ratio of induced to basal level; I — a level at the onset of the disease; II — a level in dynamics, 14 days later; p_1 — significance level of differences comparing parameters between patients and healthy donors, Mann-Whitney U-test; p_2 — significance level of differences comparing parameters between groups of patients with mild or moderate severity, Mann-Whitney U-test; p_3 — significance level of differences comparing parameters in patients in dynamics between I and II: at disease onset and 14 days later, Wilcoxon test.

положительно коррелировали с концентрацией СРБ в сыворотке периферической крови ($r = 0,62$ и $r = 0,66$, $p < 0,001$ в обоих случаях).

В то же время ЛПС-индуцированная секреция мононуклеарными клетками одного из основных провоспалительных цитокинов — TNF α в культурах, полученных от больных острым ИКБ, продемонстрировала отрицательную корреляционную связь со значениями максимальной высоты лихорадки ($r = -0,62$, $p < 0,001$). Хотя статистически значимой корреляционной зависимости между уровнями ЛПС-стимулированной секреции в культуре другого провоспалительного интерлейкина — IL-6 — и максимальной температурой тела выявить не удалось ($r = -0,19$, $p > 0,05$), но ИС продукции как IL-6, так и TNF α в группе больных ИКБ также находились в обратной корреляционной связи с высотой лихорадки в первые дни заболевания ($r = -0,65$, $p < 0,001$ и $r = -0,58$, $p = 0,001$).

Обсуждение

Исследование секреции цитокинов в условиях *in vitro* позволяет получить информацию о потенциальных секреторных возможностях мононуклеарных клеток в ответ на различные стимулы, включающие антигены или митогены, которые в целом отражают изменения иммунного ответа у пациентов с изучаемой патологией [5]. Основными рецепторами распознавания врожденного иммунитета, которые взаимодействуют с патоген-специфическими молекулярными структурами, включая ЛПС, являются Toll-подобные рецепторы (TLR) [5]. Бактериальный ЛПС распознается TLR4 при участии белков MD-2 и CD14, после чего возможна активация двух сигнальных путей: один путь, опосредованный адаптерным белком — фактором миелоидной дифференцировки 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88), инициирует экспрессию генов провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-6 и IL-12 посредством транскрипционного ядерного фактора каппа (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells, NF- κ B), а другой — MyD88-независимый путь приводит к секреции противовирусных интерферонов I типа (IFN α и IFN β) [14]. В результате взаимодействия с TLR-4 рецепторами бактериальный ЛПС инициирует изменения в макрофагах, моноцитах и других АПК, вызывая экспрессию генов IL-1 β , IL-6 и TNF α , индуцирует поликлональную активацию В-клеток, а также в присутствии макрофагов/моноцитов способствует выживанию и активации CD4⁺ Т-лимфоцитов [5, 14].

Известно, что боррелии *Borrelia burgdorferi s. l.* не имеют ЛПС, но обладают липопroteинами — outer surface proteins (Osp) A и OspB, которые распознаются TLR2, инициируя врожден-

ный иммунный ответ, который во многом имеет сходство с эффектами ЛПС, что обусловлено универсальностью MyD88-опосредованного сигнального пути для всех TLR, за исключением TLR3, приводящего к стимуляции секреции похожего спектра провоспалительных цитокинов посредством NF- κ B [13, 14, 25].

Установлено, что в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров, индуцированных как ЛПС, так и антигенами живых боррелий разных видов (*B. garinii*, *B. afzelii* или *B. burgdorferi*), сходным образом уже в первые часы после стимуляции значительно повышается секреция провоспалительных цитокинов, включая TNF α и IL-6, а затем — регуляторного интерлейкина IL-10, что согласуется с полученными нами данными [16, 22].

Провоспалительные цитокины, продуцируемые макрофагами и дендритными клетками в ответ на ЛПС или липопroteины OspA и OspB, *Borrelia burgdorferi s. l.* являются эндогенными пирогенами и вызывают системную реакцию, известную как реакция острой фазы [5, 23, 25]. Установлено, что часть пациентов с острым ИКБ, включая больных с ЭФ этого заболевания, имеет повышенные концентрации СРБ — более 3 мг/л или даже более 10 мг/л в сыворотке крови [9, 23].

Известно, что в сыворотке крови больных острым ИКБ в начале заболевания существенно повышены уровни провоспалительных цитокинов IL-2, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , IFN γ и Т-клеточных хемокинов (CCL19, CXCL9, CXCL10) по сравнению со здоровыми людьми [10, 21]. Исследование M.J. Soloski с соавт. [21] позволило выделить две группы больных острым и подострым ИКБ с высокими или низкими уровнями СРБ и другими показателями острой фазы воспаления в сыворотке крови, которые отличались по тяжести течения заболевания, а также имели существенные различия уровней концентрации провоспалительных цитокинов, главным образом IL-6, и Т-клеточных хемокинов. Пациенты с ранней локализованной или диссеминированной инфекцией ИКБ, имеющие повышенные уровни СРБ в сыворотке крови, отличались большим числом симптомов в начале заболевания, частым развитием лимфопении в гемограмме, быстрой сероконверсией и более частым повышением уровней активности печеночных ферментов в сыворотке крови [21]. Кроме того, в этой группе больных уровни концентраций IL-6 в сыворотке крови длительно сохранялись повышенными после курса антибиотикотерапии, возвращаясь к нормальным значениям спустя несколько месяцев после начала заболевания [21].

В результате настоящего исследования было показано, что уровни базальной и ЛПС-стимулированной продукции TNF α , IL-6 и IL-10,

по-видимому, зависят от степени тяжести течения изолированной и смешанной инфекции ЭФ ИКБ, поскольку среди обследованных нами пациентов клинически можно было выделить группу больных, которые отличались более выраженными проявлениями лихорадочно-интоксикационного синдрома, соответствующими среднетяжелому течению болезни, повышением уровней СРБ в сыворотке крови, свидетельствующим о воспалении низкой интенсивности, а также увеличением уровней спонтанной секреции всех трех изученных цитокинов в культуре мононуклеарных клеток. Вместе с тем, нам не удалось выявить различия числа лимфоцитов в гемограмме, уровней активности АЛТ или АСТ в сыворотке крови, а также существенных различий в сероконверсии между пациентами с легким и среднетяжелым течением ЭФ ИКБ. Изменения базальной и ЛПС-индуцированной продукции TNF α , IL-6 и IL-10 после курса антибиотикотерапии, по-видимому, отражают особенности развития и динамику формирования эффективного иммунного ответа на возбудитель у больных с различной степенью тяжести течения заболевания, поскольку в период наблюдения у обследованных нами пациентов не было выявлено признаков рецидива болезни.

По данным Л.Д. Шарифуллиной с соавт. [10], показано, что пациенты с острым ИКБ, имевшие среднюю степень тяжести болезни, по сравнению с больными с легким течением продемонстрировали в начале заболевания существенно более высокие уровни провоспалительных цитокинов — TNF α , IL-18 и IL-8 в сыворотке крови с постепенным снижением их концентраций после антибиотикотерапии в динамике [10]. Уровни IL-6 в сыворотке крови также были повышены по сравнению с контролем, но не зависели от степени тяжести заболевания, а концентрации IL-10 существенно возрастали только у пациентов, имевших среднетяжелое течение [10]. В другом исследовании было показано, что у больных ЭФ острого ИКБ повышенные уровни IL-2 в сыворотке крови (концентрации TNF α и IL-6 не определялись) положительно коррелировали с высотой лихорадки [6].

Таким образом, высокие концентрации провоспалительных цитокинов в сыворотке крови или в супернатантах нестимулированных культур мононуклеарных клеток у больных острым ИКБ, по-видимому, являются косвенными показателями, отражающими более выраженную активность воспалительного процесса и проявления лихорадочно-интоксикационного синдрома.

В супернатантах культур обследованных нами больных с изолированной и смешанной инфекцией ЭФ острого ИКБ средней степени тяжести в начале заболевания было вы-

явлено существенное подавление уровней ЛПС-стимулированной продукции провоспалительных цитокинов TNF α и IL-6 при одновременном повышении секреции регуляторного цитокина IL-10. Уровни TNF α ЛПС-индуцированной секреции в этой группе пациентов имели тенденцию к повышению в динамике после курса антибиотикотерапии в период реконвалесценции.

Установлено, что у больных сепсисом, а также тяжелыми инфекциями, вызванными грамотрицательными бактериями, в частности, у пациентов с брюшным тифом, в начале заболевания ЛПС-стимулированная продукция провоспалительных цитокинов TNF α и IL-1 β в культурах лейкоцитов также была подавлена, находясь в зависимости от тяжести течения заболевания и продолжительности реконвалесценции, что авторы связывали с эффектами их антагонистов, включая регуляторный цитокин IL-10 [15, 24]. Известно, что хотя TNF α обладает рядом нежелательных системных эффектов, этот цитокин играет важную роль во врожденном иммунном ответе, являясь индуктором местного воспалительного ответа, который помогает сдерживать инфекцию, усиливая миграцию нейтрофилов и моноцитов/макрофагов, фагоцитоз бактерий и апоптоз инфицированных клеток и имеет существенное значение для эрадикации боррелий [5, 11, 12].

Не исключено, что выявленная нами обратная корреляционная связь между продукцией TNF α и IL-10 в ЛПС-индуцированных культурах мононуклеарных лейкоцитов, полученных от больных острым ИКБ в начале заболевания, подтверждает роль регуляторного цитокина IL-10 в подавлении стимулированной секреции TNF α . Известно, что IL-10 играет ключевую роль в контроле воспаления, что, прежде всего, обусловлено его способностью подавлять функции АПК, ингибировать продукцию этими клетками TNF α и IL-6, а также секрецию Th1-специфических цитокинов [19], что, по-видимому, в некоторых случаях может препятствовать развитию адекватного врожденного иммунного ответа и элиминации боррелии [11, 12, 20]. Тем не менее у обследованных нами пациентов с ЭФ ИКБ в течение срока наблюдения не было выявлено случаев рецидива заболевания. Показано, что экспрессия IL-10 жестко регулируется во избежание заболеваний, связанных с его избытком или недостатком, с помощью механизма отрицательной обратной связи [19]. Поэтому активация NF- κ B, индуцированная ЛПС или липопротеинами Osp боррелий, приводящая к экспрессии генов провоспалительных цитокинов, сопровождается стимуляцией экспрессии гена IL-10 в мононуклеарных клетках [17, 19].

Заключение

Таким образом, установлено, что в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови больных с изолированной и микстинфекцией ЭФ острого ИКБ в начале заболевания уровни базальной секреции TNF α , IL-6 и IL-10 повышались с увеличением тяжести течения заболевания и выраженности лихорадочно-интоксикационного синдрома, по-видимому, отражая активность воспалительного процесса. Кроме того, в первую неделю болезни ЛПС-индуцированная продукция прежде всего TNF α и, в меньшей степени, IL-6 в культурах мононуклеарных лейкоцитов больных ЭФ ИКБ, имеющих среднетяжелое течение, существенно подавлялась, что, предположительно, связано с регуляторными эффектами IL-10 и, возможно, обусловлено наруше-

нием кооперативного взаимодействия иммунокомпетентных клеток при развитии реакции врожденного иммунного ответа на возбудитель. Тем не менее, поскольку стимулированная продукция TNF α восстанавливалась после курса антибиотикотерапии, а среди обследованных нами больных не было выявлено рецидивов заболевания, то изменения базальной и ЛПС-индуцированной продукции TNF α , IL-6 и IL-10, по-видимому, отражают особенности развития и динамику формирования эффективного иммунного ответа на возбудитель у больных ЭФ ИКБ с различной степенью тяжести течения заболевания.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Бараулина А.С., Кологринова Е.Н., Жукова О.Б., Чечина О.Е. Особенности продукции цитокинов при хронизации иксодового клещевого боррелиоза // Бюллетень сибирской медицины. 2010. Т. 9, № 1. С. 21–25. [Baraulina A.S., Kologrivova Ye.N., Zhukova O.B., Chechina O.Ye. Characteristics of production cytokines in patients with development of chronic tick-borne borreliosis. *Byulleten' sibirskoi meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2010, vol. 9, no. 1, pp. 21–25. (In Russ.)]
2. Бондаренко А.Л., Сапожникова В.В. Анализ клинико-эпидемиологических, лабораторных показателей и цитокинового статуса у пациентов с эритемной и безэритемной формами иксодового клещевого боррелиоза // Инфекционные болезни. 2018. Т. 16, № 2. С. 34–42. [Bondarenko A.L., Sapozhnikova V.V. Analysis of clinical-epidemiological, laboratory parameters and cytokine status in patients with erythematous and non-erythematous forms of ixodes tick borreliosis. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2018, vol. 16, no. 2, pp. 34–42. (In Russ.)] doi: 10.20953/1729-9225-2018-2-34-42
3. Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA: учебное пособие для вузов. М.: Горячая линия-Телеком, 2013. 288 с. [Borovikov V.P. Popular introduction to contemporary data analysis in STATISTICA. *Moscow: Goryachaya liniya-Telekom*, 2013. 288 p. (In Russ.)]
4. Лобзин Ю.В., Усков А.Н., Козлов С.С. Лайм-боррелиоз: иксодовые клещевые боррелиозы. СПб.: Фолиант, 2000. 156 с. [Lobzin Yu.V., Uskov A.N., Kozlov S.S. Lyme borreliosis: ixodid tick-borne borreliosis. *St. Peterburg: Foliant*, 2000. 156 p. (In Russ.)]
5. Мерфи К., Уивер К. Иммунология по Джанвю. М.: Логосфера, 2020. 1184 с. [Murphy K., Weaver C. *Janeway's Immunology*. *Moscow: Logosfera*, 2020. 1184 p. (In Russ.)]
6. Мошкова Д.Ю., Авдеева М.Г. Клинико-иммунологические особенности воспалительного процесса при клещевом боррелиозе // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2016. Т. 21, № 2. С. 86–92. [Moshkova D.Yu., Avdeeva M.G. Clinical and immunological features of inflammation in Lyme borreliosis. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2016, vol. 21, no. 2, pp. 86–92. (In Russ.)] doi: 10.18821/1560-9529-2016-21-2-86-92
7. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 216 с. [Petrie A., Sabin K. *Medical statistics at a glance*. *Moscow: GEOTAR-Media*, 2015. 216 p. (In Russ.)]
8. Рудакова С.А., Теслова О.Е., Муталинова Н.Е., Пенъевская Н.А., Блох А.И., Рудаков Н.В., Савельев Д.А., Кузьменко Ю.Ф., Транквилевский Д.В. Обзор эпидемиологической ситуации по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2013–2022 гг. и прогноз на 2023 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2023. № 2. С. 75–87. [Rudakova S.A., Teslova O.E., Mutalinova N.E., Pen'evskaya N.A., Blokh A.I., Rudakov N.V., Savel'ev D.A., Kuz'menko Yu.F., Trankvilevsky D.V. Review of the epidemiological situation on ixodic tick-borne borrelioses in the Russian Federation in 2013–2022 and forecast for 2023. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2023, no. 2, pp. 75–87. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2023-2-75-87
9. Суздальцев А.А., Каравашкин Н.В., Кулагина А.П. Клинико-эпидемиологические аспекты иксодового клещевого боррелиоза в Самарской области // Медицинский вестник Башкортостана. 2021. Т. 16, № 3 (93). С. 27–32. [Suzdaltcev A.A., Karavashkin N.V., Kulagina A.P. Clinical and epidemiological aspects of ixodic tick-borne borreliosis in the Samara region. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana = Bashkortostan Medical Journal*, 2021, vol. 16, no. 3(93), pp. 27–32. (In Russ.)]
10. Шарифуллина Л.Д., Мурзабаева Р.Т., Гареев Е.М. Иммунологические особенности воспалительного процесса в остром периоде иксодовых клещевых боррелиозов // Медицинский вестник Башкортостана. 2017. Т. 12, № 5 (71). С. 69–74. [Sharifullina L.D., Murzabaeva R.T., Gareev E.M. Immunological peculiarities of the inflammatory process in the acute period of ixodic tick-borne borreliosis. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana = Bashkortostan Medical Journal*, 2017, vol. 12, no. 5(71), pp. 69–74. (In Russ.)]
11. Badawi A. The potential of Omics technologies in Lyme disease biomarker discovery and early detection. *Infect. Dis. Ther.*, 2017, vol. 6, no. 1, pp. 85–102. doi: 10.1007/s40121-016-0138-6
12. Bamm V.V., Ko J.T., Mainprize I.L., Sanderson V.P., Wills M.K.B. Lyme disease frontiers: reconciling borrelia biology and clinical conundrums. *Pathogens*, 2019, vol. 8, no. 4: 299. doi: 10.3390/pathogens8040299

13. Benjamin S.J., Hawley K.L., Vera-Licona P., La Vake C.J., Cervantes J.L., Ruan Y., Radolf J.D., Salazar J.C. Macrophage mediated recognition and clearance of *Borrelia burgdorferi* elicits MyD88-dependent and -independent phagosomal signals that contribute to phagocytosis and inflammation. *BMC Immunol.*, 2021, vol. 22, no. 1: 32. doi: 10.1186/s12865-021-00418-8
14. Ciesielska A., Matyjek M., Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol. Life Sci.*, 2021, vol. 78, no. 4, pp. 1233–1261. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y
15. House D., Chinh N.T., Hien T.T., Parry C.P., Ly N.T., Diep T.S., Wain J., Dunstan S., White N.J., Dougan G., Farrar J.J. Cytokine release by lipopolysaccharide-stimulated whole blood from patients with typhoid fever. *J. Infect. Dis.*, 2002, vol. 186, no. 2, pp. 240–205. doi: 10.1086/341298
16. Janský L., Reymánová P., Kopecký J. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by *Borrelia*. *Physiol. Res.*, 2003, vol. 52, no. 6, pp. 593–598.
17. Marques A., Schwartz I., Wormser G.P., Wang Y., Hornung R.L., Demirkale C.Y., Munson P.J., Turk S.P., Williams C., Lee C.R., Yang J., Petzke M.M. Transcriptome assessment of erythema migrans skin lesions in patients with early Lyme disease reveals predominant interferon signaling. *J. Infect. Dis.*, 2017, vol. 217, no. 1, pp. 158–167. doi: 10.1093/infdis/jix563
18. Rodas L., Martínez S., Riera-Sampol A., Moir H.J., Tauler P. Blood cell in vitro cytokine production in response to lipopolysaccharide stimulation in a healthy population: effects of age, sex, and smoking. *Cells*, 2021, vol. 11, no. 1: 103. doi: 10.3390/cells11010103
19. Saraiva M., Vieira P., O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J. Exp. Med.*, 2020, vol. 217, no. 1: e20190418. doi: 10.1084/jem.20190418
20. Siebers E.M., Liedhegner E.S., Lawlor M.W., Schell R.F., Nardelli D.T. Regulatory T cells contribute to resistance against Lyme arthritis. *Infect. Immun.*, 2020, vol. 88, no. 11: e00160-20. doi: 10.1128/IAI.00160-20
21. Soloski M.J., Crowder L.A., Lahey L.J., Wagner C.A., Robinson W.H., Aucott J.N. Serum inflammatory mediators as markers of human Lyme disease activity. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 4: e93243. doi: 10.1371/journal.pone.0093243
22. Stokes J.V., Moraru G.M., McIntosh C., Kummari E., Rausch K., Varela-Stokes A.S. Differentiated THP-1 cells exposed to pathogenic and nonpathogenic borrelia species demonstrate minimal differences in production of four inflammatory cytokines. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2016, vol. 16, no. 11, pp. 691–695. doi: 10.1089/vbz.2016.2006
23. Uhde M., Ajamian M., Li X., Wormser G.P., Marques A., Alaedini A. Expression of C-reactive protein and serum amyloid a in early to late manifestations of Lyme disease. *Clin. Infect. Dis.*, 2016, vol. 63, no. 11, pp. 1399–1404. doi: 10.1093/cid/ciw599
24. Winkler M.S., Rissiek A., Priefler M., Schwedhelm E., Robbe L., Bauer A., Zahrt C., Zoellner C., Kluge S., Nierhaus A. Human leucocyte antigen (HLA-DR) gene expression is reduced in sepsis and correlates with impaired TNF α response: a diagnostic tool for immunosuppression? *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 8: e0182427. doi: 10.1371/journal.pone.0182427
25. Woitzik P., Linder S. Molecular mechanisms of *Borrelia burgdorferi* phagocytosis and intracellular processing by human macrophages. *Biology (Basel)*, 2021, vol. 10, no. 7: 567. doi: 10.3390/biology10070567

Авторы:

Ильинских Е.Н., д.м.н., доцент, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Воронкова О.В., д.м.н., доцент, зав. кафедрой биологии и генетики ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Хасанова Р.Р., к.м.н., доцент кафедры биологии и генетики ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Самойлов К.В., ординатор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Семенова А.В., ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Есимова И.Е., д.м.н., доцент кафедры биологии и генетики ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Мотлохова, Е.А., студент ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Ямпольская О.В., студент ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Ямпольская А.В., студент ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия.

Authors:

Ilyinskikh E.N., DSc (Medicine), Associate Professor, Professor of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Voronkova O.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Hasanova R.R., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Samoylov K.V., Resident Physician, Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Semenova A.V., Assistant Professor, Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Esimova I.E., DSc (Medicine), Associate Professor, Department of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Motlokhova E.A., Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Yampolskaya O.V., Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Yampolskaya A.V., Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

МИКРОБНЫЕ АССОЦИАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПНЕВМОНИЙ И УРОВЕНЬ ИХ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

О.Н. Колотова, Л.В. Катаева, А.А. Вакарина, Т.Ф. Степанова, К.Б. Степанова

ФБУН Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора,
г. Тюмень, Россия

Резюме. *Введение.* Бактериальную коинфекцию и вторичную бактериальную инфекцию принято считать критическими факторами риска тяжести течения и смертности от вирусной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2. Цель исследования: анализ структуры микробных ассоциаций *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*, изолированных из отделяемого нижних дыхательных путей и секционного материала (ткани легкого) пациентов с диагнозом «Пневмония», и сравнительной характеристики уровня их резистентности в монокультуре и в ассоциациях в период пандемии новой коронавирусной инфекции. *Материалы и методы.* Проведено бактериологическое исследование 2689 образцов мокроты и промывных вод бронхов от пациентов инфекционных госпиталей и 1411 образцов патологоанатомического материала легких. Изоляты бактерий идентифицированы методом масс-спектрометрии. Чувствительность бактерий к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом. Генетические детерминанты резистентности к бета-лактамам обнаружены методом ПЦР. Статистическая обработка результатов выполнена в программе SPSS, версия 22. *Результаты.* Изоляты *K. pneumoniae* и *A. baumannii* преимущественно находились в ассоциации из двух и трех патогенов. Установлено, что уровень резистентности изолятов *K. pneumoniae* в ассоциации с *A. baumannii* статистически значительно выше по сравнению с резистентностью их в монокультуре по всем исследованным антимикробным препаратам. При этом *K. pneumoniae* в сочетании с *Candida* spp. имели статистически значимо низкий уровень резистентности к ципрофлоксацину, амикацину, цефотаксиму, цефтазидиму и амоксициллин/клавулановой кислоте, чем в монокультуре. Изоляты *K. pneumoniae* являлись носителями детерминант резистентности к бета-лактамазам расширенного спектра действия: OXA-48 — (22,5%), OXA-51 — (5,6%), OXA-23 — (4,2%), KPC — 70,9%, NDM — 7%. Из них 14,1% штаммов обладали способностью копродукции сериновых карбапенемаз OXA-48 и KPC. Выделенные из мокроты и ткани легкого изоляты *A. baumannii* проявляли экстремально высокие уровни множественной резистентности вне зависимости от наличия ассоциаций с другими микроорганизмами. Выявлено видовое сходство микробиома отделяемого нижних дыхательных путей и ткани легкого. Доля резистентных штаммов *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, выделенных из ткани легкого, достоверно выше в сравнении с изолированными из мокроты. *Заключение.* Обнаружение в об-

Адрес для переписки:

Колотова Ольга Николаевна
625026, Россия, г. Тюмень, ул. Республики, 147,
ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (3452) 28-99-94, 8 904 461-24-65.
E-mail: Vakarinaaaa@tniikip.rosпотребнадzor.ru

Contacts:

Olga N. Kolotova
625026, Russian Federation, Tyumen, Republic str., 147,
Tyumen Region Infection Pathology Research Institute.
Phone: +7 (3452) 28-99-94, +7 904 461-24-65.
E-mail: Vakarinaaaa@tniikip.rosпотребнадzor.ru

Для цитирования:

Колотова О.Н., Катаева Л.В., Вакарина А.А., Степанова Т.Ф.,
Степанова К.Б. Микробные ассоциации возбудителей пневмоний
и уровень их резистентности к антимикробным препаратам в период
пандемии новой коронавирусной инфекции // Инфекция и иммунитет.
2023. Т. 13, № 6. С. 1069–1078. doi: 10.15789/2220-7619-MAF-17541

Citation:

Kolotova O.N., Kataeva L.V., Vakarina A.A., Stepanova T.F., Stepanova K.B.
Microbial associations for pneumonia causative agents and level of their
resistance to antimicrobial drugs during a new coronavirus infection pandemic //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13,
no. 6, pp. 1069–1078. doi: 10.15789/2220-7619-MAF-17541

разре биоматериала изолятов *K. pneumoniae* и *A. baumannii*, обладающих множественной резистентностью к антимикробным препаратам, а также их ассоциаций, может свидетельствовать об усугублении тяжести течения пневмонии.

Ключевые слова: пневмония, коинфекция, ассоциации патогенов, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, SARS-CoV-2, резистентность.

MICROBIAL ASSOCIATIONS FOR PNEUMONIA CAUSATIVE AGENTS AND LEVEL OF THEIR RESISTANCE TO ANTIMICROBIAL DRUGS DURING A NEW CORONAVIRUS INFECTION PANDEMIC

Kolotova O.N., Kataeva L.V., Vakarina A.A., Stepanova T.F., Stepanova K.B.

Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* Bacterial coinfection and secondary bacterial infection are considered critical risk factors for the severity and mortality of SARS-CoV-2-caused pneumonia. The aim of the study was to analyze a pattern of microbial associations between *K. pneumoniae* and *A. baumannii* isolated from the lower respiratory tract discharge and sectional material (lung tissue) of patients diagnosed with pneumonia, and to compare resistance level in monoculture and associations during new coronavirus infection pandemic. *Materials and methods.* A bacteriological study of 2689 sputum and bronchial washing samples from patients at infectious diseases hospitals, and 1411 lung pathological material samples was carried out. Bacterial isolates were identified by mass spectrometry. Antibiotic sensitivity for isolates was determined by the disk diffusion method. Genetic determinants of resistance to beta-lactam antibiotics were detected by PCR. Statistical data processing was performed using SPSS version 22 software. *Results.* *K. pneumoniae* and *A. baumannii* isolates were predominantly found in two- and three-pathogen associations. It was established that the resistance level of *K. pneumoniae* isolates in association with *A. baumannii* is significantly higher compared to that in monoculture for all antimicrobial drugs studied. At the same time, *K. pneumoniae* in combination with *Candida* spp. vs monoculture showed significantly lower level of resistance to ciprofloxacin, amikacin, cefotaxime, ceftazidime and amoxicillin/clavulanic acid. *K. pneumoniae* isolates carried resistance determinants to extended-spectrum beta-lactamases: OXA-48 — (22.5%), OXA-51 — (5.6%), OXA-23 — (4.2%), KPC — 70.9%, NDM — 7%. Of these, 14.1% of strains had the ability to co-produce serine carbapenemases OXA-48 and KPC. Sputum and lung tissue *A. baumannii* isolates exhibited extremely high multiple resistance regardless of their associations with other microorganisms. Microbiome species similarity in the lower respiratory tract and lung tissue discharge was revealed. The proportion of lung tissue vs sputum resistant strains of *K. pneumoniae* and *A. baumannii* was significantly higher. *Conclusion.* The detection of multiple drug resistant *K. pneumoniae* and *A. baumannii* isolates as well as their associations may indicate aggravated pneumonia severity.

Key words: pneumonia, coinfection, pathogen associations, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, SARS-CoV-2, resistance.

Введение

Воспалительные процессы нижних дыхательных путей, обусловленные бактериальными возбудителями, являются наиболее распространенными среди людей [24, 26]. По данным Росздравнадзора, в 2020 г. (разгар пандемии COVID-19) в России зафиксирован рост заболеваемости внебольничной пневмонией на 258% по сравнению с предыдущим годом [2]. В этиологии этого заболевания преобладают коинфекции, возбудителями которых являются вирусы, бактерии и грибы [1, 15, 16]. Особенностью инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, является снижение функции защитных барьерных тканей и клеток иммунной системы [3, 20], поэтому риск развития бактериального поражения легких во время пандемии активизировал назначение антимикробной терапии для лечения пневмоний. Широкое применение антибиотиков привело к резкому увеличению количества циркулирующих резистентных штаммов [14, 17, 23]. Особое внимание привлекают бактерии, относящиеся

к группе ESKAPE-патогенов. Наличие у пациентов микроорганизмов, обладающих множественной лекарственной резистентностью (MDR), можно рассматривать как один из предикторов госпитальной летальности [10, 21].

Наиболее значимыми возбудителями вторичных бактериальных инфекций в отделениях интенсивной терапии являются бактерии *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*, обладающие множественной и экстремальной резистентностью к антимикробным препаратам. По данным исследований группы авторов [6, 11], эти виды бактерий определены как доминирующие патогены, способствующие переходу вирусной пневмонии при COVID-19 в вирусно-бактериальную. Кроме того, описаны случаи выявления изолятов *Enterococcus faecium* и коагулазонегативных стафилококков, устойчивых к широкому ряду антибактериальных препаратов [19]. Вместе с тем у пациентов с диагнозом «Пневмония, ассоциированная с COVID-19», возможна кандидозная инфекция, обусловленная иммуносупрессией и проявляющаяся неинвазивным бронхоле-

гочным поражением [22]. В литературных источниках широко представлены данные о структуре возбудителей пневмоний, характеристике их резистентности, но встречаются только единичные исследования, посвященные изучению влияния ассоциаций патогенов возбудителей пневмоний на уровень их резистентности к антимикробным препаратам [5, 6]. Возможный обмен генетическими детерминантами резистентности в ассоциациях бактерий является главной причиной возникновения множественной лекарственной устойчивости, что подтверждает актуальность исследования и требует дальнейшего изучения.

Таким образом, изучение структуры ассоциаций этиологически значимых возбудителей и уровня их резистентности к антимикробным препаратам имеет практическое значение для подбора корректной терапии. Это будет способствовать повышению эффективности этиотропного лечения, сокращению длительности болезни и снижению уровня смертности.

Цель исследования: анализ структуры микробных ассоциаций *K. pneumoniae* и *A. baumannii*, изолированных из отделяемого нижних дыхательных путей и секционного материала (ткани легкого) пациентов с диагнозом «Пневмония», и сравнительной характеристики уровня их резистентности в монокультуре и ассоциациях в период пандемии новой коронавирусной инфекции.

Материалы и методы

Проведено бактериологическое исследование 2689 образцов биоматериала (мокрота, промывные воды бронхов) пациентов, находящихся на лечении в инфекционных ковидных госпиталях с апреля 2020 г. по ноябрь 2022 г. В направлениях к биоматериалу, поступившему на исследование, был указан диагноз «Внебольничная пневмония». Все пациенты вне зависимости от наличия у них вируса SARS-CoV-2 проявляли симптомы пневмонии и получали лечение в различных отделениях стационаров, в том числе в отделении интенсивной терапии. Отбор материала осуществлялся в разные периоды лечения пациентов. Посев образцов биоматериала и выделение культур микроорганизмов проводились классическим бактериологическим методом. Видовая идентификация осуществлялась методом MALDI-ToF масс-спектрометрии с программным обеспечением Maldi BioTyper 3.0. Уровень достоверности выше 2,0 свидетельствовал о точной видовой идентификации. В этот же период исследовано 1411 образцов аутопсийного материала (ткань легкого) от пациентов с диагнозом «Пневмония».

Изоляты *K. pneumoniae* (71) исследованы методом ПЦР в режиме реального времени. Для определения генов резистентности молеку-

лярных классов А, В, D к бета-лактамам антибиотикам использовали набор «БакРезиста» (ООО «ДНК-Технология», Россия). ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия).

Чувствительность изолятов к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом, использовали индикаторные диски с лекарственными препаратами: ципрофлоксацин, амикацин, цефотаксим, цефтазидим, цефепим, имипенем, меропенем, амоксициллин/клавулановая кислота, ампициллин/сульбактам, производства ООО «НИЦФ» Россия. Оценку результатов осуществляли в соответствии с Клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», версия 2018-03 (актуален в период исследования до 2021 г.), а также версия 2021-01.

Полученные результаты исследований представлены в электронных таблицах и диаграммах Microsoft Office Excel 2019. Статистическая обработка полученных результатов выполнена лицензионным программным обеспечением SPSS, версия 22, предназначенным для научных исследований. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей с указанием 95% доверительных интервалов (ДИ) — метод Клоппера—Пирсона. При оценке непараметрических величин рассчитывали критерий χ^2 Пирсона или точный критерий Фишера (если число наблюдений в любой из ячеек четырехпольной таблицы 2×2 меньше 5). Различия полученных значений считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Непараметрический критерий Краскела—Уоллиса применен для оценки частоты обнаружения изолятов в монокультуре и ассоциациях.

Результаты

Бактериологические исследования проб отделяемого нижних дыхательных путей показали, что в 1668 (62,0%) образцах были обнаружены грибы рода *Candida*, из которых не менее 90% составляли *C. albicans*. Из грамотрицательных бактерий преимущественно встречались *K. pneumoniae* — 360 (13,4%), *A. baumannii* — 214 (7,9%), *Escherichia coli* — 59 (2,2%), *Pseudomonas aeruginosa* — 54 (2,3%), *Pseudomonas fluorescens* — 6 (0,2%), *Citrobacter freundii* — 9 (0,3%). В группе грамположительных кокков преобладали *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus haemolyticus* — 218 (8,1%), *E. faecium* и *E. faecalis* — 79 (2,9%).

Бактерии *K. pneumoniae* в монокультуре изолированы в 85 (23,6%) [95% ДИ: 19,32–28,34] образцах. Структура ассоциаций *K. pneumoniae* представлена преимущественно двумя, тремя, реже — четырьмя и пятью видами микроорганизмов (табл. 1).

Так, группа изолятов из двух патогенов составила 61,2% [95% ДИ: 55,05–66,89], на долю группы из трех изолятов приходилось 36,4% [95% ДИ: 30,67–42,35]. Наиболее частыми ассоциантами *K. pneumoniae* в данных группах являлись грибы рода *Candida* и грамотрицательные бактерии. Причем в первой группе грамотрицательные бактерии преобладали в 2,4 раза в сравнении с грамположительными. Ассоциации из четырех и пяти микроорганизмов составляли 2,5% [95% ДИ: 1,03–5,17]. Установлены статистически значимые различия количества обнаруженных изолятов *K. pneumoniae* в ассоциации с одним, двумя и более патогенами в одном образце биоматериала (непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, $p = 0,009$).

Результаты определения чувствительности к антимикробным препаратам показали, что штаммы *K. pneumoniae* в целом (в монокультуре и в ассоциации) проявляли резистентность к амоксициллин/клавулановой кислоте в 83,1% случаев, ципрофлоксацину в 77,2%, цефотаксиму — 76,9%, цефтазидиму — 73,6%, амикацину — 52,8%, карбапенемам (имипенем, меропенем) — 55,6%. Установлено, что резистентность изолятов *K. pneumoniae* в ассоциации с *A. baumannii* статистически значимо выше по сравнению с резистентностью в монокультуре по каждому исследованному антибиотику: ципрофлоксацину ($p = 0,004$), амикацину ($p = 0,0001$), цефотак-

симу ($p = 0,013$), цефтазидиму ($p = 0,0001$), амоксициллин/клавулановой кислоте ($p = 0,0001$), имипенему ($p = 0,0001$), меропенему ($p = 0,0001$). Резистентность *K. pneumoniae* в ассоциации с *Candida* spp. достоверно ниже уровня их резистентности в монокультуре к ципрофлоксацину ($p = 0,0001$), амикацину ($p = 0,014$), цефотаксиму ($p = 0,0001$), цефтазидиму ($p = 0,014$) и амоксициллин/клавулановой кислоте ($p = 0,013$) (рис. 1). Вместе с тем сравнительная характеристика резистентности штаммов *K. pneumoniae* в монокультуре и в ассоциациях с *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. haemolyticus* статистически значимых различий не выявила ($p > 0,05$).

Определение генов резистентности к бета-лактамам антибиотикам методом ПЦР выявило изоляты *K. pneumoniae*, способные продуцировать бета-лактамазы расширенного спектра действия молекулярного класса А: SHV — 65 (91,5%) [95% ДИ: 82,51–96,84], TEM — 49 (69,0%) [95% ДИ: 56,92–79,46], CTX-M-1 — 29 (40,8%) [95% ДИ: 29,32–53,16]. Исследование этих же изолятов диско-диффузионным методом установило наличие резистентности к амоксициллин/клавулановой кислоте и цефалоспорином III поколения, что свидетельствует об экспрессии выявленных генов. Кроме того, обнаружено несколько типов генов карбапенемаз: NDM — 5 (7,0%); оксациллиназы:

Таблица 1. Видовая структура микробных ассоциаций *K. pneumoniae*, изолированных из мокроты пациентов (n = 275)

Table 1. Species pattern for microbial associations of *K. pneumoniae* isolated from patient sputum (n = 275)

Ассоциации изолятов Isolate associations	n	%	95% ДИ 95% CI
<i>K. pneumoniae</i> (<i>Candida</i> spp.)	92	33,5	27,9–39,37
<i>K. pneumoniae</i> (<i>A. baumannii</i>)	30	11	7,48–15,21
<i>K. pneumoniae</i> (<i>E. coli</i>)	24	8,7	5,67–12,71
<i>K. pneumoniae</i> (<i>E. faecalis</i>)	8	2,9	1,26–5,65
<i>K. pneumoniae</i> (<i>S. aureus</i>)	8	2,9	1,26–5,65
<i>K. pneumoniae</i> (<i>S. haemolyticus</i>)	6	2,2	0,8–4,69
<i>K. pneumoniae</i> (<i>A. baumannii</i> , <i>Candida</i> spp.)	18	6,6	3,93–10,15
<i>K. pneumoniae</i> (<i>E. coli</i> , <i>Candida</i> spp.)	16	5,8	3,36–9,28
<i>K. pneumoniae</i> (<i>E. faecium</i> / <i>E. faecalis</i> , <i>Candida</i> spp.)	16	5,8	3,36–9,28
<i>K. pneumoniae</i> (<i>S. aureus</i> / <i>S. haemolyticus</i> , <i>Candida</i> spp.)	14	5,1	2,81–8,39
<i>K. pneumoniae</i> (<i>A. baumannii</i> , <i>S. aureus</i> / <i>S. haemolyticus</i>)	11	4	2,01–7,04
<i>K. pneumoniae</i> (<i>P. aeruginosa</i> / <i>P. fluorescens</i> , <i>Candida</i> spp.)	6	2,2	0,8–4,69
<i>K. pneumoniae</i> (<i>A. baumannii</i> , <i>E. faecium</i> / <i>E. faecalis</i>)	5	1,8	0,59–4,19
<i>K. pneumoniae</i> (<i>S. maltophilia</i> , <i>Candida</i> spp.)	5	1,8	0,59–4,19
<i>K. pneumoniae</i> (<i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i>)	4	1,5	0,4–3,68
<i>K. pneumoniae</i> (<i>E. coli</i> , <i>S. maltophilia</i>)	3	1,1	0,23–3,15
<i>K. pneumoniae</i> (<i>P. aeruginosa</i> , <i>C. freundii</i>)	1	0,4	0,01–2,01
<i>K. pneumoniae</i> (<i>A. baumannii</i> , <i>S. maltophilia</i>)	1	0,4	0,01–2,01
<i>K. pneumoniae</i> (<i>A. baumannii</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Candida</i> spp.)	3	1,1	0,23–3,15
<i>K. pneumoniae</i> (<i>S. aureus</i> , <i>E. faecium</i> / <i>E. faecalis</i> , <i>Candida</i> spp.)	2	0,7	0,09–2,6
<i>K. pneumoniae</i> (<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Candida</i> spp.)	1	0,4	0,01–2,01
<i>K. pneumoniae</i> (<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i>)	1	0,4	0,01–2,01

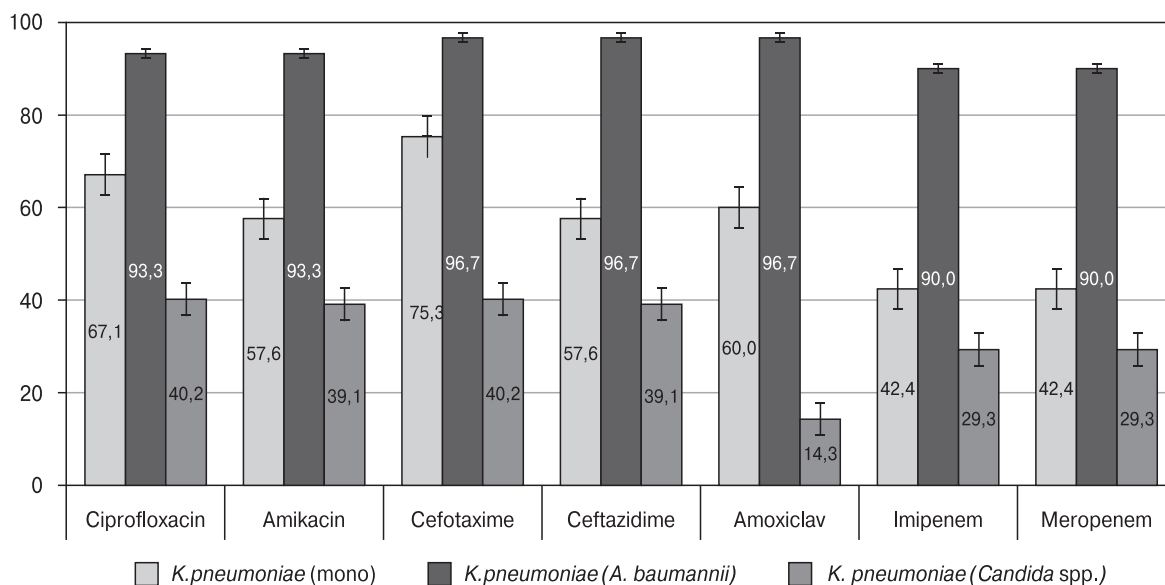


Рисунок 1. Резистентность к антимикробным препаратам штаммов *K. pneumoniae* в монокультуре и ассоциациях с *A. baumannii* и *Candida* spp.

Figure 1. Antimicrobial resistance of *K. pneumoniae* strains in monoculture and associations with *A. baumannii* and *Candida* spp.

ОХА-48 — 16 (22,5%), ОХА-51 — 4 (5,6%), ОХА-23 — 3 (4,2%), указывающих на способность бактерий инактивировать карбапенемы, другие бета-лактамы и металло-бета-лактамазы. Следует отметить, что у 55 штаммов (77,5%) [95% ДИ: 66,0–86,54] обнаружены гены сериновых бета-лактамаз КРС, из них только у 39 (70,9%) [95% ДИ: 57,1–82,37] обнаружена резистентность к имипенему и меропенему диско-диффузионным методом. Выделены 10 (14,1%) [95% ДИ: 6,97–24,38] штаммов *K. pneumoniae*, имеющих в составе два гена сериновых карбапенемаз — ОХА-48 и КРС.

Изоляты *A. baumannii* в монокультуре были обнаружены в 53 пробах, что составило 24,7% [95% ДИ: 19,04–30,97]. Анализ ассоциаций бактерий *A. baumannii* выявил их сочетание преимущественно с грибами рода *Candida* — 98 (60,9%), ассоциации с грамотрицательными бактериями встречались в 3 раза чаще, чем с грамположительными. В структуре ассоциантов *A. baumannii* преобладала группа из двух изолятов, она составила 70,8% [95% ДИ: 63,13–77,71], группа из трех изолятов — 20,5% [95% ДИ: 14,55–27,56], реже регистрировалась группа из четырех ассоциантов — 8,7% [95% ДИ: 4,84–14,16] (табл. 2). Установлены статистически значимые различия частоты обнаружения изолятов *A. baumannii* в ассоциации с одним, двумя и более патогенами в одном образце биоматериала (непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, $p = 0,0001$).

Анализ резистентности к антибиотикам всех изолятов *A. baumannii*, вне зависимости от микробных ассоциаций, выявил их множествен-

ную устойчивость. Так, к ципрофлоксацину резистентность проявляли 100% исследованных штаммов, к цефепиму — 196 (91,6%), амикацину — 142 (87,6%), имипенему — 134 (82,7%) и меропенему — 137 (84,6%). Зарегистрировано наименьшее количество штаммов, резистентных к ампициллин/сульбактаму — 120 (74,1%).

Изоляты *A. baumannii* в монокультуре проявляли резистентность в 100% случаев к ципрофлоксацину, цефалоспорином IV поколения, карбапенемам (имипенему и меропенему); к амикацину — 98,1%; ампициллин/сульбактаму — 94,3% (табл. 3). Следует отметить, что в ассоциациях с другими микроорганизмами штаммы *A. baumannii* также проявляли экстремально высокие уровни резистентности к исследованным антибиотикам.

Анализ изолятов, выделенных из патологоанатомического материала (ткани легкого), показал преобладание среди грамотрицательных бактерий *K. pneumoniae* — 741 (52,5%), а также наличие *A. baumannii* — 368 (26,1%), *E. coli* — 130 (9,2%), *Proteus mirabilis* — 70 (5,0%). В структуре грамположительных кокков чаще были идентифицированы *E. faecium* — 313 (22,2%) и *S. aureus* — 80 (5,7%).

Из образцов ткани легкого были выделены 344 изолята *K. pneumoniae* в монокультуре, что составило 24,4% от числа всех исследованных проб. Ассоциации *K. pneumoniae* с грамотрицательными и грамположительными бактериями определены практически в равных долях. Почти в 90% случаев (352) *K. pneumoniae* находились в ассоциации из двух патогенов. Установлены статистически значимые различия частоты обнаружения штаммов *K. pneumoniae* в ассоциа-

ции с одним, двумя и более изолятами в одном образце биоматериала (непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, $p = 0,0001$).

Все изоляты *K. pneumoniae*, выделенные из образцов патологоанатомического материала, отмечались высоким уровнем резистентности к широкому спектру антимикробных препаратов: ципрофлоксацину — 662 (89,3%), к амикацину — 461 (62,2%), цефтазидиму — 649 (87,7%), цефотаксиму — 679 (91,6%), имипенему — 572 (77,2%), меропенему — 570 (76,9%).

Изоляты *K. pneumoniae* в монокультуре проявляли высокий уровень устойчивости к амоксициллин/клавулановой кислоте (92,4%), ципрофлоксацину (86,9%), цефтазидиму (88,4%), цефотаксиму (88,4%), амикацину (60,8%), имипенему (74,1%) и меропенему (73,2%). Выявлен статистически значимый более высокий уровень резистентности штаммов *K. pneumoniae*, находящихся в ассоциациях с *A. baumannii*: к цефотаксиму ($p = 0,007$), цефтазидиму ($p = 0,022$), имипенему ($p = 0,009$) и меропенему ($p = 0,011$) в сравнении

Таблица 2. Структура микробных ассоциаций *A. baumannii*, изолированных из мокроты пациентов (n = 161)

Table 2. Species pattern for microbial associations of *A. baumannii* isolated from patient sputum (n = 161)

Ассоциации изолятов Isolate associations	n	%	95% ДИ 95% CI
<i>A. baumannii</i> (<i>Candida</i> spp.)	51	31,7	24,56–39,46
<i>A. baumannii</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	30	18,6	12,94–25,52
<i>A. baumannii</i> (<i>E. coli</i>)	13	8,1	4,37–13,41
<i>A. baumannii</i> (<i>E. faecium</i> / <i>E. faecalis</i> / <i>E. durans</i>)	8	5,0	2,17–9,56
<i>A. baumannii</i> (<i>S. aureus</i> / <i>S. haemolyticus</i>)	8	5,0	2,17–9,56
<i>A. baumannii</i> (<i>P. aeruginosa</i>)	4	2,5	0,68–6,24
<i>A. baumannii</i> (<i>K. pneumoniae</i> , <i>Candida</i> spp.)	18	11,2	6,76–17,09
<i>A. baumannii</i> (<i>E. faecium</i> / <i>E. faecalis</i> , <i>Candida</i> spp.)	7	4,3	1,77–8,75
<i>A. baumannii</i> (<i>S. haemolyticus</i> , <i>Candida</i> spp.)	5	3,1	1,02–7,1
<i>A. baumannii</i> (<i>E. coli</i> , <i>Candida</i> spp.)	3	1,9	0,39–5,35
<i>A. baumannii</i> (<i>P. aeruginosa</i> / <i>P. fluorescens</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Candida</i> spp.)	5	3,1	1,02–7,1
<i>A. baumannii</i> (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> / <i>S. haemolyticus</i> , <i>Candida</i> spp.)	4	2,5	0,68–6,24
<i>A. baumannii</i> (<i>E. faecium</i> / <i>E. faecalis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>Candida</i> spp.)	3	1,9	0,39–5,35
<i>A. baumannii</i> (<i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Candida</i> spp.)	2	1,2	0,15–4,42

Таблица 3. Резистентность штаммов *A. baumannii* в монокультуре и в ассоциации из двух микробных культур

Table 3. Drug resistance of *A. baumannii* strains in monoculture and dual microbial cultures

Антибиотик Antibiotic	Штамм Strain					
	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	<i>A. baumannii</i> (<i>E. coli</i>)	<i>A. baumannii</i> (<i>E. faecium</i> / <i>E. faecalis</i> / <i>E. durans</i>)	<i>A. baumannii</i> (<i>S. aureus</i> / <i>S. haemolyticus</i>)	<i>A. baumannii</i> (<i>Candida</i> spp.)
	n = 53/%	n = 30/%	n = 13/%	n = 8/%	n = 8/%	n = 51/%
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	53 100,0	30 100,0	13 100,0	8 100,0	8 100,0	51 100,0
Амикацин Amikacin	52 98,1	28 93,3	12 92,3	8 100,0	8 100,0	47 92,2
Цефепим Cefepime	53 100,0	30 100,0	12 92,3	8 100,0	8 100,0	47 92,2
Ампициллин/ сульбактам Ampicillin/sulbactam	50 94,3	28 93,3	11 84,6	7 87,5	5 62,5	47 92,2
Имипенем Imipenem	53 100,0	28 93,3	12 92,3	8 100,0	8 100,0	46 90,2
Меропенем Meropenem	53 100,0	28 93,3	12 92,3	8 100,0	8 100,0	47 92,2

Примечание. n — количество исследованных штаммов.

Note. n — is the number of studied strains.

с резистентностью изолятов *K. pneumoniae* в монокультуре. Также значительно выше показатели резистентности к ципрофлоксацину изолятов *K. pneumoniae* в ассоциации с *E. coli* ($p = 0,024$). Штаммы *K. pneumoniae*, находящиеся в ассоциациях с *Enterococcus* spp., проявляли более высокий уровень резистентности к ципрофлоксацину ($p = 0,014$), цефтазидиму ($p = 0,012$) и цефотаксиму ($p = 0,012$) в сравнении с их резистентностью в монокультуре.

Установлено, что количество резистентных штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из ткани легкого, достоверно больше в сравнении с изолированными из отделяемого нижних дыхательных путей по всем исследованным антимикробным препаратам: ципрофлоксацину ($p = 0,0001$), амикацину ($p = 0,003$), цефотаксиму ($p = 0,0001$), цефтазидиму ($p = 0,0001$), амоксициллин/клавулановой кислоте ($p = 0,0001$), имипенему ($p = 0,0001$), меропенему ($p = 0,0001$). Доли резистентных штаммов *K. pneumoniae* представлены на рис. 2.

Из патологоанатомического материала выделены 148 (40,2%) штаммов *A. baumannii* в монокультуре. В структуре ассоциаций: 186 (84,5%) изолятов *A. baumannii* находились в группе из двух патогенов; 32 (14,5%) штамма в группе из трех и 2 штамма в ассоциации из четырех. Установлены статистически значимые различия частоты обнаружения изолятов *A. baumannii* в ассоциации с одним, двумя и более патогенами в одном образце биоматериала (непараметрический критерий

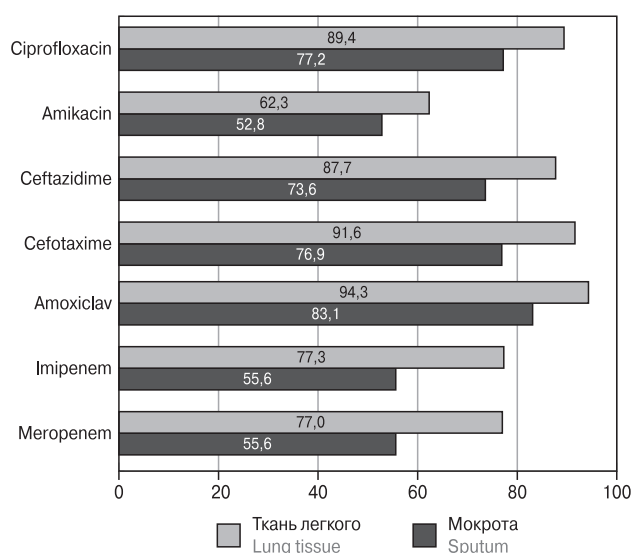


Рисунок 2. Сравнительная характеристика уровня резистентности штаммов *K. pneumoniae*, изолированных из отделяемого нижних дыхательных путей и ткани легкого (%)

Figure 2. Comparative characteristics of resistance level for *K. pneumoniae* strains isolated from lower respiratory tract and lung tissue discharge (%)

Краскела–Уоллиса, $p = 0,0001$). Ассоциации изолятов *A. baumannii* с грамтрицательными бактериями регистрировались в 2 раза чаще, чем в сочетании с грамположительными кокками.

Бактерии *A. baumannii*, выделенные из ткани легкого, вне зависимости от микробных ассоциаций проявляли высокий уровень резистентности к основным группам антимикробных препаратов более чем в 97,0% случаев, исключение составляет ампициллин/сульбактам, резистентность к которому проявляли 76,1% исследованных штаммов. Статистически значимо более низкий уровень резистентности к ампициллин/сульбактаму определен у изолятов *A. baumannii*, находящихся в ассоциации с *Enterococcus* spp. ($\chi^2 = 4,056$, $p = 0,044$) в сравнении с устойчивостью штаммов *A. baumannii* в монокультуре. Статистически значимых различий резистентности к антимикробным препаратам штаммов *A. baumannii* в монокультуре и в ассоциациях с *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* не выявлено.

Установлено, что резистентные к антимикробным препаратам штаммы *A. baumannii* достоверно чаще изолировались из патологоанатомического материала, чем из мокроты: ципрофлоксацин ($p = 0,006$), амикацин ($p = 0,00001$), цефепим ($p = 0,014$), имипенем ($p = 0,002$), меропенем ($p = 0,010$), исключение составил ампициллин/сульбактам ($p = 0,847$). Доли резистентных штаммов *A. baumannii* представлены на рис. 3.

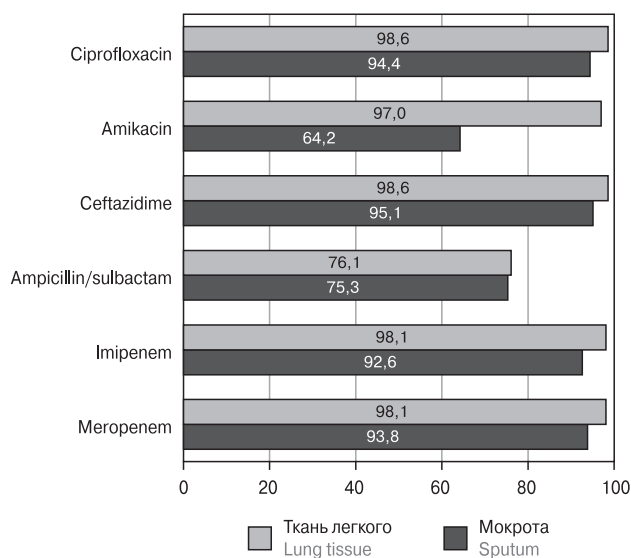


Рисунок 3. Сравнительная характеристика уровня резистентности штаммов *A. baumannii*, изолированных из отделяемого нижних дыхательных путей и ткани легкого (%)

Figure 3. Comparative characteristics of resistance level for *A. baumannii* strains isolated from lower respiratory tract and lung tissue discharge (%)

Обсуждение

Среди пациентов, инфицированных респираторными вирусами, случаи вторичной коинфекции или вторичной бактериальной пневмонии составляют 11–35%. В период пандемии COVID-19 возбудителями коинфекций чаще были грибы рода *Candida* и грамотрицательные бактерии — *A. baumannii* и *K. pneumoniae* [7, 8, 12], что сопоставимо с результатами нашего исследования. По данным Левченко К.В. [5], двух-трехкомпонентные бактериальные ассоциации в мокроте пациентов были обнаружены в 52% случаев. Настоящее исследование показало, что ведущие грамотрицательные патогены — *K. pneumoniae* и *A. baumannii* — более чем в 90% случаев находились в двух-трехкомпонентных микст-колонизациях.

Ряд авторов [5, 18] утверждают, что штаммы *K. pneumoniae*, изолированные из мокроты пациентов с диагнозом пневмония на фоне COVID-19 в 47,5–50% проявляли резистентность к цефтазидиму, при этом резистентных к амикацину штаммов не было выявлено. Однако проанализированные нами изоляты проявляли резистентность к цефтазидиму в 87,7%, к амикацину — в 62,3% случаев. При этом доля резистентных ко всем исследованным антибиотикам изолятов *K. pneumoniae* в ассоциации с *A. baumannii* была статистически значимо выше, чем в монокультуре или в ассоциациях с другими микробными патогенами. Выявлено, что штаммы *K. pneumoniae* в ассоциации с грибами рода *Candida* проявляли статистически значимо низкий уровень резистентности к цефтазидиму, цефепиму, амикацину и ампициллин/сульбактаму. Высокий уровень устойчивости к цефалоспорином и пенициллинам подтверждается наличием генов резистентности бета-лактамаз класса А. Также обнаружены изоляты *K. pneumoniae*, обладающие способностью к копродукции ферментов двух сериновых карбапенемаз ОХА-48 и КРС, при этом 60% из них находились в ассоциациях с другими микроорганизмами. Данное сочетание сериновых карбопенемаз в геноме одного штамма считается редким явлением и до пандемии COVID-19 не регистрировалось в России [9].

Известно, что *A. baumannii* обладает устойчивостью к таким антимикробным препаратам, как аминопенициллины, цефалоспорины, хлорамфеникол, а также аминогликозиды, фторхинолоны и тетрациклины широкого спектра действия [4, 25, 27]. Результаты настоящего исследования также показали, что изоляты *A. baumannii* проявляли высокий уровень множественной резистентности к основным

группам антимикробных препаратов вне зависимости от вида и количества ассоциантов в образцах биоматериала.

В литературных источниках [22] указывается, что при исследовании патологоанатомических материалов (тканей легкого умерших в период пандемии) выявлены признаки микробной коинфекции. Установлено, что 95% летальных исходов являлись следствием бактериальной пневмонии, а не первичной вирусной. Аналогичными исследованиями показано, что у 32% пациентов были потенциальные бактериальные суперинфекции легких [13, 28]. Нами выявлено, что не менее чем в 52,5% образцов биоматериала изолировались грамотрицательные бактерии, грамположительные выявлены в 22,2%. Исследование показало сходство видовой структуры патогенов, изолированных из мокроты и ткани легкого. В патологоанатомическом материале зарегистрировано количественное преобладание бактерий *K. pneumoniae* и *A. baumannii* (в 3 раза). При этом уровень резистентности к антибиотикам данных патогенов, выделенных из ткани легкого статистически значимо выше, чем у изолятов, выделенных из отделяемого нижних дыхательных путей, что свидетельствует об их этиологической роли в развитии тяжелого течения пневмонии, приводящего к летальному исходу.

Таким образом, обнаружение бактериальных ассоциаций *K. pneumoniae* с *A. baumannii* или штаммов *A. baumannii*, обладающих множественной резистентностью, в одном образце биоматериала пациентов является прогностически неблагоприятным для течения пневмонии и требует коррекции антибиотикотерапии.

Дополнительная информация

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора № 1 от 15.03.2023 г.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Список литературы/References

1. Балмасова И.П., Малова Е.С., Сепиашвили Р.И. Вирусно-бактериальные коинфекции как глобальная проблема современной медицины // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2018. Т. 1, № 22. С. 29–42. [Balmasova I.P., Malova E.S., Sepiashvili R.I. Viral and bacterial coinfection as a global problem of modern medicine. *Vestnik Rossiiskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Meditsina = Bulletin of the Peoples' Friendship University of Russia. Journal of Medicine*, 2018, vol. 1, no. 22, pp. 29–42. (In Russ.)] doi: 10.22363/2313-0245-2018-22-1-29-42
2. Зайратьянц О.В., Самсонова М.В., Черняев А.Л., Мишнев О.Д., Михалева Л.М., Крупнов Н.М., Калинин Д.В. Патологическая анатомия COVID-19: опыт 2000 аутопсий // Судебная медицина. 2020. Т. 6, № 4. С. 10–23. [Zayratyants O.V., Samsonova M.V., Cherniaev A.L., Mishnev O.D., Mikhaleva L.M., Krupnov N.M., Kalinin D.V. COVID-19 pathology: experience of 2000 autopsies. *Sudebnaya meditsina = Forensic Medicine*, 2020, vol. 6, no. 4, pp. 10–23. (In Russ.)] doi: 10.19048/fm340
3. Землянко О.М., Рогоза Т.М., Журавлева Г.А. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам // Экологическая генетика. 2018. Т. 3, № 16. С. 4–17. [Zemlyanko O.M., Rogoza T.M., Zhuravleva G.A. Mechanisms of bacterial multiresistance to antibiotics. *Ekologicheskaya genetika = Environmental genetics*, 2018, vol. 3, no. 16, pp. 4–17. (In Russ.)] doi: 10.17816/ecogen1634-17
4. Кисиль О.В., Ефименко Т.А., Габриэлян Н.И., Ефременкова О.В. Разработка методов антимикробной терапии, преодолевающих антибиотикорезистентность *Acinetobacter baumannii* // Acta Naturae. 2020. Т. 12, № 3. С. 34–45. [Kisil O.V., Efimenko T.A., Gabrielyan N.I., Efremenkova O.V. Development of antimicrobial therapy methods to overcome the antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Acta Naturae*, 2020, vol. 12, no. 3, pp. 34–45. (In Russ.)] doi: 10.32607/actanaturae.10955
5. Левченко К.В., Бондаренко В.Н., Мицура В.М., Тапальский Д.В. Вирусно-бактериальная пневмония при COVID-19: клинико-лабораторная характеристика пациентов и спектр бактериальных возбудителей // Проблемы здоровья и экологии. 2023. Т. 20, № 2. С. 27–34. [Levchenko K.V., Bondarenko V.N., Mitsura V.M., Tapalski D.V. Viral-bacterial pneumonia in COVID-19: clinical and laboratory characteristics of patients and a spectrum of bacterial pathogens. *Problemy zdorov'ya i ekologii = Health and Ecology Issues*, 2023, vol. 20, no. 2, pp. 27–34. (In Russ.)] doi: 10.51523/2708-6011.2023-20-2-04
6. Митрохин С.Д., Орлова О.Е., Янковская О.С., Гостева И.В., Галицкий А.А., Карпова И.В., Ведяшкина С.Г., Шкода А.С. Опыт применения антибактериальной терапии у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 на госпитальном этапе лечения (предварительные итоги и рекомендации) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2022. Т. 24, № 2. С. 181–192. [Mitrokhin S.D., Orlova O.E., Yankovskaya O.S., Gosteva I.V., Galitsky A.A., Karpova I.V., Vedyashkina S.G., Skoda A.S. Real-life antimicrobial therapy in hospitalized patients with COVID-19 (preliminary results and recommendations). *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2022, vol. 24, no. 2, pp. 181–192. (In Russ.)] doi: 10.36488/cmac.2022.2.181-192
7. Ортенберг Э.А. Почти два года с COVID-19: новые аспекты использования антибиотиков // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2021. Т. 23, № 3. С. 246–251. [Ortenberg E.A. Almost two years with COVID-19: some aspects of antibiotic use. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2021, vol. 23, no. 3, pp. 246–251. (In Russ.)] doi: 10.36488/cmac.2021.3.248-253
8. Ромашов О.М., Ни О.Г., Быков А.О., Круглов А.Н., Проценко Д.Н., Тюрин И.Н. Оценка резистентности микроорганизмов многопрофильного стационара и модернизация схем антимикробной терапии в условиях пандемии COVID-19-инфекции // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2021. Т. 23, № 3. С. 293–303. [Romashov O.M., Ni O.G., Bykov A.O., Kruglov A.N., Protsenko D.N., Tyurin I.N. Antimicrobial resistance and antimicrobial therapy modification during COVID19 pandemic in large tertiary hospital. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2021, vol. 23, no. 3, pp. 293–303. (In Russ.)] doi: 10.36488/cmac.2021.3.293-303
9. Тапальский Д.В., Карпова Е.В., Акуленок О.М., Окулич В.К., Генералов И.И., Лескова Н.Ю., Антонова Е.Г., Жильцов И.В., Осипкина О.В., Можаровская Л.В., Баранов О.Ю. Антибиотикорезистентность *Klebsiella pneumoniae* на фоне пандемии COVID-19: опыт многопрофильного стационара // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2021. Т. 10, № 3. С. 15–22. [Tapalskiy D.V., Karpova E.V., Akulenok O.M., Okulich V.K., Generalov I.I., Leskova N.Yu., Antonova E.G., Zhiltsov I.V., Osipkina O.V., Mozharovskaya L.V., Baranov O.Yu. Antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* against the background of the COVID-19 pandemic: experience of the multidisciplinary hospital. *Infekcionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2021, vol. 10, no. 3, pp. 15–22. (In Russ.)] doi: 10.33029/2305-3496-2021-10-3-15-22
10. Appaneal H.J., Lopes V.V., LaPlante K.L., Caffrey A.R. Treatment, clinical outcomes, and predictors of mortality among a national cohort of admitted patients with *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2022, vol. 66, no. 3: e0197521. doi: 10.1128/AAC.01975-21
11. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., Qiu Y., Wang J., Liu Y., Wei Y., Xia J., Yu T., Zhang X., Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 2020, no. 395, pp. 507–513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7
12. Chen X., Liao B., Cheng L., Peng X., Xu X., Li Y., Hu T., Li J., Zhou X., Ren B. The microbial coinfection in COVID-19. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2020, vol. 104, no. 18, pp. 7777–7785. doi: 10.1007/s00253-020-10814-6
13. Clancy C.J., Schwartz I.S., Kula B., Nguyen M.H.. Bacterial superinfections among persons with Coronavirus disease 2019: a comprehensive review of data from postmortem studies. *Open Forum Infect. Dis.*, 2021, vol. 8, no. 3: ofab065. doi: 10.1093/ofid/ofab065
14. Cohen R., Babushkin F., Finn T., Geller K., Alexander H., Datnow C., Uda M., Shapiro M., Paikin S., Lellouche J. High rates of bacterial pulmonary co-infections and superinfections identified by multiplex PCR among critically ill COVID-19 patients. *Microorganisms*, 2021, vol. 9, no. 12: 2483. doi: 10.3390/microorganisms9122483
15. Hasani A., Soltani E., Ahangaradeh Rezaee M., Pirzadeh T., Ahangar Oskouee M., Hasani A., Gholizadeh P., Oskouee A.N., Binesh E. Serotyping of *Klebsiella pneumoniae* and its relation with capsule-associated virulence genes, antimicrobial resistance pattern, and clinical infections: a descriptive study in medical practice. *Infect. Drug Resist.*, 2020, no. 13, pp. 1971–1980. doi: 10.2147/IDR.S243984

16. Hughes S., Troise O., Donaldson H., Mughal N., Moore L.S.P. Bacterial and fungal coinfection among hospitalised patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a UK secondary care setting. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2020, vol. 26, no. 10, pp. 1395–1399. doi: 10.1016/j.cmi.2020.06.025
17. Lai C.C., Wang C.Y., Hsueh P.R. Co-infections among patients with COVID-19: the need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents? *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2020, vol. 53, no. 4, pp. 505–512. doi: 10.1016/j.jmii.2020.05.013
18. Marua A.M., Shethwala N.D., Bhatt P., Shah A. Evaluation of bacterial co-infections and antibiotic resistance in positive COVID-19 patients. *Maedica (Bucur)*, 2022, vol. 17, no. 2, pp. 350–356. doi: https://doi: 10.26574/maedica.2022.17.2.350.
19. May L., Klein E.Y., Rothman R.E., Laxminarayan R. Trends in antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci in the United States, 1999 to 2012. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, vol. 3, no. 58, pp. 1404–1409. doi: 10.1128/AAC.01908-13
20. Mirzaei R., Goodarzi P., Asadi M., Soltani A., Aljanabi H.A.A., Jeda A.S., Dashtbin S., Jalalifar S., Mohammadzadeh R., Teimoori A., Tari K., Salari M., Ghiasvand S., Kazemi S., Yousefimashouf R., Keyvani H., Karampoor S. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. *IUBMB Life*, 2020, vol. 72, no. 10, pp. 2097–2111. doi: 10.1002/iub.2356
21. Munier A.L., Biard L., Legrand M., Rousseau C., Lafaurie M., Donay J.L., Flicoteaux R., Mebazaa A., Mimoun M., Molina J.M. Incidence, risk factors and outcome of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections during an outbreak in a burn unit. *Int. J. Infect. Dis.*, 2019, no. 79, pp. 179–184. doi: 10.1016/j.ijid.2018.11.371
22. Nafsa A., Maiesha S.M., Ullah M.A., Araf Y., Rahaman T.I., Moin A.T., Hosen M.J. COVID-19-associated candidiasis: possible patho-mechanism, predisposing factors, and prevention strategies. *Curr. Microbiol.*, 2022, vol. 79, no. 5: 127. doi: 10.1007/s00284-022-02824-6
23. Rawson T.M., Moore L.S.P., Zhu N., Ranganathan N., Skolimowska K., Gilchrist M., Satta G., Cooke G., Holmes A. Bacterial and fungal coinfection in individuals with coronavirus: a rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 71, no. 9, pp. 2459–2468. doi: 10.1093/cid/ciaa530
24. Santella B., Serrettiello E., De Filippis A., Folliero V., Iervolino D., Dell'Annunziata F., Manente R., Valitutti F., Santoro E., Pagliano P., Galdiero M., Boccia G., Franci G. Lower respiratory tract pathogens and their antimicrobial susceptibility pattern: a 5-year study. *Antibiotics*, 2021, no. 10: 851. doi: 10.3390/antibiotics10070851
25. Teng G., Wang N., Nie X., Zhang L., Liu H. Analysis of risk factors for early-onset ventilator-associated pneumonia in a neurosurgical intensive care unit. *BMC Infect. Dis.*, 2022, no. 22: 66. doi: 10.1186/s12879-022-07053-7
26. Torres A., Cilloniz C., Niederman M.S., Menéndez R., Chalmers J.D., Wunderink R.G., Poll T. Pneumonia. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2021, no. 7, pp. 25. doi: 10.1038/s41572-021-00259-0
27. Ulu-Kilic A., Gundogdu A., Cevahir F., Kilic H., Gunes T., Alp E. An outbreak of bloodstream infection due to extensively resistant *Acinetobacter baumannii* among neonates. *Am. J. Infect. Control*, 2018, vol. 46, no. 2, pp. 154–158. doi: 10.1016/j.ajic.2017.08.007
28. Wu H.Y., Chang P.H., Chen K.Y., Lin I.F., Hsieh W.H., Tsai W.L., Chen J.A., Lee S.S.; GREAT working group. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) associated bacterial coinfection: incidence, diagnosis and treatment. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2022, vol. 55, no. 6, pp. 985–992. doi: 10.1016/j.jmii.2022.09.006

Авторы:

Колотова О.Н., младший научный сотрудник бактериологической лаборатории ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Катаева Л.В., д.м.н., главный научный сотрудник, зав. бактериологической лабораторией ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Вакарина А.А., к.м.н., старший научный сотрудник бактериологической лаборатории ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Степанова Т.Ф., д.м.н., профессор, директор ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Степанова К.Б., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клиники и иммунологии биогельминтозов ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия.

Authors:

Kolotova O.N., Junior Researcher, Bacteriological Laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Kataeva L.V., DSc (Medicine), Head Researcher, Head of the Bacteriological Laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Vakarina A.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Bacteriological Laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Stepanova T.F., DSc (Medicine), Professor, Director of Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Stepanova K.B., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Clinics and Immunology of Biohelminthiasis, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation.

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ НА СОСТАВ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

М.М. Юнусбаева¹, Д.Р. Терентьева^{1,2}, Л.Я. Бородин³, А.М. Закирова³, Ш.Э. Булатов³,
Ф.С. Билалов^{4,5}, Б.Б. Юнусбаев⁶

¹ ФГАОУ ВО Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

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

³ ГБУЗ Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер, г. Уфа, Россия

⁴ ГБУЗ Республиканский медико-генетический центр, г. Уфа, Россия

⁵ ФГБОУ ВО Башкирский государственный университет г. Уфа, Россия

⁶ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Использование длительной многокомпонентной антибиотикотерапии является самым эффективным способом лечения туберкулеза (ТБ). Однако мало известно о влиянии данной химиотерапии на кишечную микрофлору человека. Целью данного исследования является изучение влияния длительной многокомпонентной антибиотикотерапии на состав и метаболический профиль кишечного микробиома больных ТБ. В исследовании использовались образцы ДНК фекалий, полученные от 23 больных туберкулезом легких. От каждого пациента было получено две пробы биоматериала: до начала лечения и через два месяца после прохождения интенсивной фазы химиотерапии. Сравнительный анализ метагеномных данных секвенирования микробиома кишечника больных ТБ показал, что длительный многокомпонентный режим лечения ТБ не нарушает общего разнообразия микробиома кишечника, однако оказывает влияние на бактериальный состав и метаболический профиль микробиома. На фоне приема противотуберкулезных препаратов (ПТП) первого ряда (изониазид, рифампицин, этамбутол, пипразинамид) наблюдается статистически значимое увеличение представителей филума *Actinobacteria*. Парное сравнение метагеномных данных пациентов выявило 28 дифференциально представленных таксонов бактерий, из которых три вида *Bacteroides cellulosilyticus*, *Enterocloster aldensis*, *Clostridium spiroforme* преобладали в микробиоме больных ТБ после прохождения химиотерапии, тогда как 25 видов преобладали в группе больных до лечения (*Bifidobacterium catenulatum*, *Enterococcus faecium*, *Bacteroides salyersiae*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Bacteroides eggerthii*, *Lachnospira eligens*, *Akkermansia muciniphila*, *Ruminococcus lactaris* и др.) ($p < 0,05$). Метаболический профиль микробиома кишечника характеризовался

Адрес для переписки:

Юнусбаева Милляуша Мусиевна
191002, Россия, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9,
ФГАОУ ВО Национальный исследовательский
университет ИТМО.
Тел.: 8 927 326-14-60
E-mail: milyausha_ufa@mail.ru

Contacts:

Milyausha M. Yunusbaeva
191002, Russian Federation, St. Petersburg, Lomonosova str., 9,
ITMO University.
Phone: +7 927 326-14-60
E-mail: milyausha_ufa@mail.ru

Для цитирования:

Юнусбаева М.М., Терентьева Д.Р., Бородин Л.Я., Закирова А.М.,
Булатов Ш.Э., Билалов Ф.С., Юнусбаев Б.Б. Влияние длительной
антибиотикотерапии на состав и метаболический профиль кишечного
микробиома при туберкулезе легких // Инфекция и иммунитет. 2023.
Т. 13, № 6. С. 1079–1088. doi: 10.15789/2220-7619-IOL-16867

Citation:

Yunusbaeva M.M., Terentyeva D.R., Borodina L.Ya., Zakirova A.M.,
Bulatov S.E., Bilalov F.S., Yunusbayev B.B. Influence of long-term antibiotic
therapy on gut microbiome composition and metabolic profile in pulmonary
tuberculosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1079–1088. doi: 10.15789/2220-7619-
IOL-16867

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 22-25-00272). Разработка вычислительных сценариев для метагеномных данных частично выполнена сотрудником лаборатории «Центр биоинформатики и алгоритмической биотехнологии» при поддержке гранта ID PURE: 94030965.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 22-25-00272). Bioinformatic pipelines for metagenomic analyses were developed partially by the research staff at the laboratory of "Center for Bioinformatics and Algorithmic Biotechnology" funded by grant ID PURE: 94030965.

усилением метаболических процессов, направленных на рост и деление микробных клеток. Железо является главным лимитирующим фактором роста и размножения. Кроме того, важно отметить превалирование гликолиза и ферментации лактата как основных способов получения энергии кишечной микробиотой.

Ключевые слова: туберкулез, микробиом кишечника, дисбиоз, кишечные бактерии, метаболизм, антибиотики.

INFLUENCE OF LONG-TERM ANTIBIOTIC THERAPY ON GUT MICROBIOME COMPOSITION AND METABOLIC PROFILE IN PULMONARY TUBERCULOSIS

Yunusbaeva M.M.^a, Terentyeva D.R.^{a,b}, Borodina L.Ya.^c, Zakirova A.M.^c, Bulatov S.E.^c, Bilalov F.S.^{d,e}, Yunusbayev B.B.^f

^a ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation

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

^c Republican Clinical Antituberculous Dispensary, Ufa, Russian Federation

^d Republic Medical Genetic Centre, Ufa, Russian Federation

^e Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

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

Abstract. The use of long-term multicomponent antibiotic therapy is the most effective way to treat tuberculosis (TB). However, little is known about the effect of this chemotherapy on the human intestinal microflora. The purpose of this study was to analyze an effect of long-term antibiotic therapy on gut microbiome composition and metabolic profile in TB patients. We used deep sequencing of fecal samples from 23 treatment-naïve TB patients to reconstruct the metabolic capacity and strain/species-level abundance in the gut microbiome. Two fecal samples were obtained from each patient: before and after treatment. We showed that TB treatment regimen does not disrupt the overall diversity of the gut microbiome but does have an impact on gut bacterial microbiome composition and metabolic profile. While taking first-line anti-tuberculosis drugs (isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide), TB patients showed an apparent increase in Actinobacteria abundance. Pairwise comparison of metagenomic data revealed 28 differentially represented bacterial taxa, of which three species *Bacteroides cellulosilyticus*, *Enterocloster aldensis*, *Clostridium spiroforme* were strongly enriched in TB patients post-chemotherapy, whereas 25 species were enriched in TB patients before treatment (*Bifidobacterium catenulatum*, *Enterococcus faecium*, *Bacteroides salyersiae*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Bacteroides eggerthii*, *Lachnospira eligens*, *Akkermansia muciniphila*, *Ruminococcus lactaris*, etc.) ($p < 0.05$). The metabolic profile of the gut microbiome was characterized by increased metabolic processes aimed at the growth and division of microbial cells. Iron is the main limiting factor for growth and reproduction. In addition, it is important to note the prevalence of glycolysis and lactate fermentation as the major means for energy production by intestinal microbiota.

Key words: tuberculosis, gut microbiome, dysbiosis, intestinal bacteria, metabolism, antibiotics.

Введение

Лечение туберкулеза (ТБ) подразумевает ежедневный прием как минимум 4–7 пероральных противотуберкулезных препаратов (ПП) в период от 6 месяцев до двух лет. Широкое использование данных режимов химиотерапии (ХТ) делает их одними из наиболее длительных курсов воздействия антибактериальных препаратов на организм человека. Основной пул противотуберкулезных препаратов, применяемых для лечения ТБ, обладает широким спектром действия и эффективен не только в отношении *M. tuberculosis*, но и против многих других бактерий [4, 27]. По этой причине можно сказать, что стандартное лечение как лекарственно-чувствительного ТБ, так и туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя, будет иметь широкий спектр эффектов на комменсальную микрофлору всего организма. Подтверждением данного факта являются многочисленные исследования, демонстрирующие влияние приема антибиотиков на течение

и исход целого ряда заболеваний [1, 14, 21]. Хотя это всего лишь несколько примеров, современная модель такова, что лечение антибиотиками может привести к установлению альтернативного состояния, которое может иметь системные и потенциально пагубные последствия для иммунитета, микробиоты и организма в целом. Несмотря на многочисленные исследования кишечных бактериальных сообществ в норме и при различных патологиях, имеется ограниченное число исследований, посвященных изучению микробиома кишечника больных ТБ, и крайне мало лонгитюдных исследований, направленных на изучение кишечной микробиоты, подвергшейся длительной массивной антибактериальной терапии. Поскольку микробиом кишечника является ключевым игроком в поддержании иммунологической толерантности и обладает иммуномодулирующей активностью, то исследование микробиома кишечника больных ТБ до и после антибиотикотерапии является чрезвычайно актуальным. Целью данной работы является изучение влияния длитель-

ной многокомпонентной антибиотикотерапии на состав и метаболический профиль кишечного микробиома больных туберкулезом легких. Для этого нами был проведен сравнительный анализ метагеномных данных shotgun секвенирования микробиома кишечника больных ТБ до начала приема ПТП и через два месяца после прохождения интенсивной фазы химиотерапии.

Материалы и методы

В работе были использованы образцы фекалий, полученные от 23 больных туберкулезом легких. Больные ТБ отбирались на базе ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер» (ГБУЗ РКПТД), г. Уфа, в период с 2019 по 2021 г. В исследование были включены только пациенты с впервые выявленным ТБ легких, соответствующие следующим критериям: 1) возраст (25–55 лет); 2) впервые выявленный ТБ легких, подтвержденный лучевыми методами диагностики (рентгенография, компьютерная томография, цифровая флюорография) и положительными результатами микробиологических и молекулярно-генетических исследований мокроты на ТБ (ПЦР тест, мазок с окраской по Цилю–Нильсену, люминесцентная микроскопия); 3) отсутствие ВИЧ-инфекции. В исследование не включались больные с ранее леченым ТБ, больные с рецидивом или отменой лечения. Кроме того, критериями исключения были серьезные сопутствующие заболевания, кровохарканье, гипоксия, внелегочный туберкулез, беременность или кормление грудью.

В структуре клинических форм преобладали инфильтративный ТБ легких (65,2%), диссеминированный ТБ (30,4%) и казеозная пневмония (4,3%). Всем пациентам, включенным в исследование, был назначен I режим ХТ (изониазид, рифампицин, пиразинамид, этамбутол) в соответствии с федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению ТБ органов дыхания. Средний возраст больных, среди которых было 14 мужчин (61%) и 9 женщин (39%), составлял 43 года (IQR 34,5–55 лет). Взятие образцов фекалий от больных ТБ осуществлялось дважды: первое — в момент поступления в стационар, строго до начала приема ПТП, второе — через два месяца прохождения интенсивной фазы ХТ. Свежие образцы стула участников собирали в стерильные одноразовые контейнеры, которые доставлялись в бактериологическую лабораторию ГБУЗ РКПТД и замораживались при температуре -80°C . Взятие биоматериала осуществлялось в соответствии с нормами и требованиями законодательства РФ. Все пациенты предоставили информированное согласие на участие в исследовании и анонимную обработку данных.

Метагеномную ДНК экстрагировали из 200 мг фекалий с использованием набора «QIAamp DNA Stool Mini Kit» (Qiagen, Германия). Библиотеки секвенирования были созданы с использованием набора для подготовки образцов «TruSeq DNA PCR-Free» (Illumina, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полногеномное секвенирование проводилось на платформе Illumina HiSeq2500. В среднем для каждого образца получено более 20 млн ридов секвенирования, что классифицируется как глубокое секвенирование.

Первоначальный контроль качества данных секвенирования, удаление адаптеров и чрезмерно коротких ридов, а также деконтаминация ДНК человека были выполнены последовательно с помощью программ FastQC v0.11.9, fastp v0.23.2 и KneadData v0.10.0 [6, 26]. Определение таксонов микроорганизмов и оценка относительной численности проводилась на базе маркерных генов с использованием программы MetaPhlan4 [3]. Последующий анализ метагеномных данных проводился с использованием пакетов программ microbiome программной среды R (<https://www.r-project.org>). Индекс Шеннона рассчитывали в пакете программ vegan R; достоверность различий между индексами Шеннона определяли с помощью теста Колмогорова. Суммарное сходство микробиоты между донорами визуализировали методом главных компонент (PCA) на основе дистанций Брэя–Кертиса в программе vegan. Для определения дифференциально представленных таксонов в парных данных больных ТБ до и после лечения был использован T-критерий Вилкоксона для зависимых выборок (Matched-pair Wilcoxon Rank Sum Test). Метаболическую способность микробиома определяли с использованием программы HUMAnN 3.6, которая сравнивает последовательности донорских метагеномов с известными микробными геномами и генами, определяет метаболические реакции, в которые включены эти гены, и агрегирует их в известные микробные пути. В частности, для биоинформатических запросов HUMAnN 3.6 использует базу данных ChocoPhlAn 3, содержащую 99,2 тыс. аннотированных эталонных геномов из 16,8 тыс. видов микробов в базе данных UniProt (январь 2019 г.) и соответствующие функционально аннотированные 87,3 млн семейств генов UniRef90 [20].

Результаты

В общей сложности в двух группах больных ТБ до начала лечения и после прохождения химиотерапии было обнаружено 719 и 632 бактериальных таксонов соответственно. Анализ разнообразия бактериальных сообществ с помо-

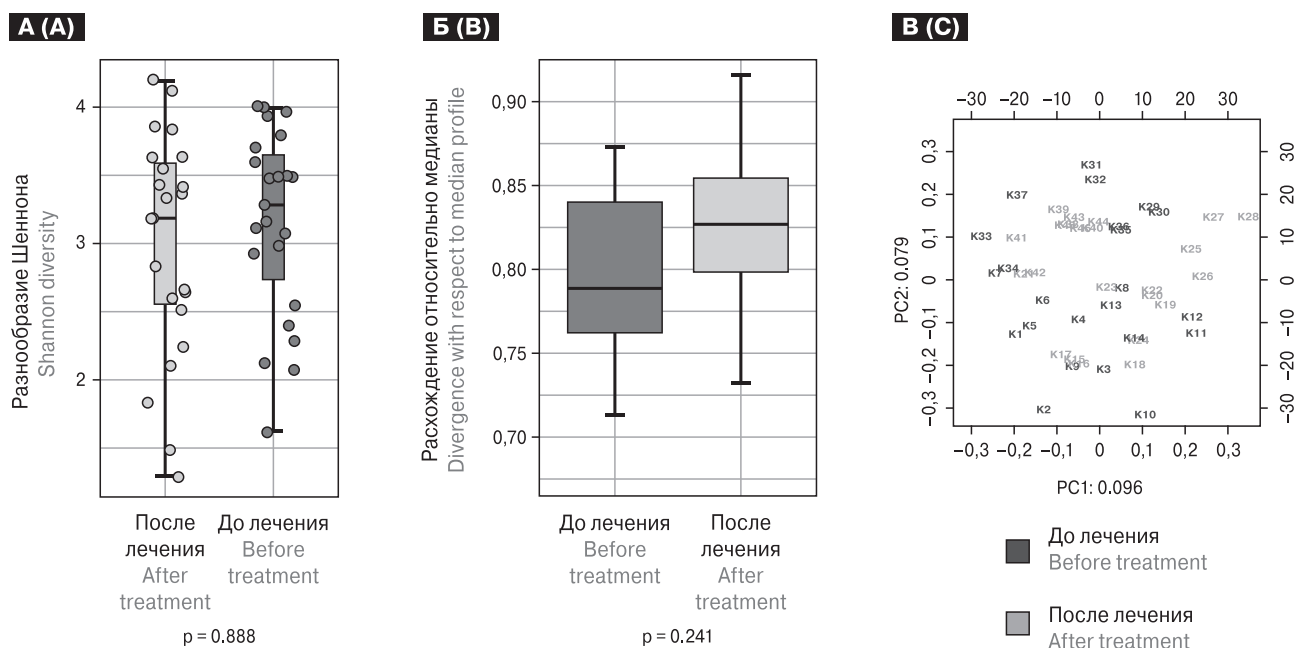


Рисунок 1. Общая характеристика бактериального сообщества кишечного микробиома больных ТБ: сравнение альфа- (А) и бета-разнообразия (Б) бактериальных сообществ микробиома больных ТБ до начала лечения и после прохождения химиотерапии; (В) анализ главных компонент варибельности микробного состава кишечника больных ТБ (PCA)

Figure 1. General characteristics of gut bacterial microbiome community in TB patients: comparison of alpha (A) and beta (B) diversity of gut microbiomes in two study groups: pre-treatment TB patients (before treatment), post-treatment TB patients (after treatment); (C) principal component analysis of microbial variability in donors (PCA)

щью параметров оценки индекса Шеннона (альфа-разнообразие) и индекса несходства Брея–Кертиса (бета-разнообразие) не показал различий между исследуемыми группами ($p = 0,888$ и $p = 0,241$ соответственно) (рис. 1А, Б). Анализ главных компонент варибельности бактериальных таксонов (PCA) также не выявил различий между группами (рис. 1В).

Сравнительный анализ таксономического состава микробиома кишечника больных ТБ до лечения и после прохождения ХТ показал, что доминирующими в обеих группах были филумы *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. Суммарная доля данных филумов достигала 90,5 и 89,8% соответственно ($p > 0,05$) (рис. 2А, II обложка). На фоне антибиотикотерапии в группе пациентов после прохождения ХТ наблюдается статистически значимое увеличение представителей филума *Actinobacteria*: 4,8% против 1,9% в группе больных до лечения ($p = 0,02$). При этом основной вклад в увеличение *Actinobacteria* вызван ростом представителей рода *Bifidobacterium* (рис. 2Г, II обложка). Несмотря на, казалось бы, видимое отсутствие различий в бактериальном составе на уровне филумов, сравнение микробиомов на уровне семейства и рода демонстрирует нам статистически значимые сдвиги в структуре микробных сообществ (рис. 2, II обложка). Так, на фоне антибиотикотерапии в микробиоме больных ТБ статистически значимо уменьшается доля семейства *Prevotellaceae* (16,14% в группе

до лечения против 6,88% в группе после ХТ, $p = 0,009$). Сравнительный анализ структуры микробиома на родовом уровне демонстрирует статистически значимое увеличение родов *Phocoecicola*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Roseburia*, *Dialister* и снижение *Prevotella*, *Clostridium*, *Lachnospira* в группе больных после лечения ($p < 0,05$).

Поскольку данные микробиома представляют собой парные данные для каждого пациента (до и после), то для анализа дифференциально представленных таксонов нами также был использован критерий Вилкоксона (Matched-pair Wilcoxon Rank Sum Test). Парное сравнение метагеномных данных позволило выявить 28 дифференциально представленных таксонов бактерий ($p < 0,05$) (рис. 3, III обложка), из которых 25 видов преобладали в группе больных до лечения: *Bifidobacterium catenulatum*, *Enterococcus faecium*, *Bacteroides salyersiae*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Bacteroides eggerthii*, *Alistipes senegalensis*, *Lachnospira eligens*, *Anaerotruncus rubiinfantis*, *Slackia isoflavoniconvertens*, *Lentisphaeria bacterium*, *Clostridia bacterium*, *Akkermansia muciniphila*, *Ruminococcus lactaris* и ряд неаннотированных бактерий *Ruminococcaceae unclassified SGB15309* и *SGB15234*, *Lachnospiraceae unclassified SGB4894*, *Dorea* sp. *AF24 7LB*, *Clostridium* sp. *AF15 49* и др.). В группе больных ТБ после лечения были увеличены только три вида бактерий *Bacteroides cellulosilyticus*, *Enterocloster aldensis*, *Clostridium spiroforme* (рис. 3А, III обложка).

Далее мы провели исследования, направленные на определение функционального профиля микробиома. После агрегации генов, идентифицированных программой HUMAnN 3.6, в метаболические пути, в общей сложности было выявлено 412 метаболических процессов, из которых 26 были дифференциально обогащены в кишечном микробиоме больных ТБ ($p < 0,05$). Причем 24 метаболических процесса были чрезмерно представлены в микробиоме больных ТБ после прохождения химиотерапии по сравнению с двумя метаболическими путями в микробиоме больных ТБ до начала лечения (табл.). Так, на фоне антибиотикотерапии усиливаются процессы, направленные на биосинтез гема (heme b biosynthesis II (oxygen-independent)), биосинтез аминокислот (superpathway of aromatic amino acid biosynthesis, superpathway of L-methionine biosynthesis (by sulfhydrylation) и др.), нуклеотидов (superpathway of guanosine nucleotides *de novo* biosynthesis I, pyrimidine deoxyribonucleotides *de novo* biosynthesis III и др.), а также увеличивается количество метаболических процессов, направленных на потребление глюкозы и ферментацию лактата (superpathway of glycolysis,

pyruvate dehydrogenase, TCA, and glyoxylate bypass, heterolactic fermentation).

Проведя кластеризацию обнаруженных метаболических процессов в пути более высокого уровня, можно увидеть усиление метаболических процессов, направленных на активный рост и деление бактерий даже на фоне длительной многокомпонентной ХТ (рис. 4). Как хорошо видно на рис. 4, в бактериальном сообществе кишечника больных ТБ, подвергшихся массивной антибиотикотерапии, активно протекают метаболические процессы синтеза аминокислот и нуклеотидов, а также усилены процессы генерации энергии и синтеза/деградации углеводов. Косвенным показателем роста и деления бактерий также является высокое количество различных метаболических процессов синтеза клеточной стенки (рис. 4, табл.).

Обсуждение

В данном исследовании нами был проведен сравнительный анализ метагеномных данных секвенирования кишечного микробиома больных ТБ до начала приема ПТП и через два месяца после прохождения интенсивной фазы ХТ.



Рисунок 4. Иерархия метаболических путей, выявленных у больных туберкулезом

Figure 4. Hierarchy of metabolic pathways enriched in TB patients

Примечание. Размер блока отражает количество уникальных метаболических путей, принадлежащих к определенному типу метаболического пути.

Note. The block size reflects the number of unique metabolic pathways belonging to a particular type of metabolic pathway.

Таблица. Метаболические пути, дифференциально представленные в микробиоме больных ТБ

Table. Metabolic pathways differentially represented in gut microbiome of TB patients

Метаболические пути Metabolic pathways	P-значение P-value	FDR (Доля ложных открытий) FDR (False discovery rate)	Группа Groups
Биосинтез гема b II (независимый от кислорода) Heme b biosynthesis II (oxygen-independent)	0,00165	0,4928	После лечения After treatment
Путь биосинтеза <i>de novo</i> гуанозиновых нуклеотидов I Superpathway of guanosine nucleotides <i>de novo</i> biosynthesis I	0,00241	0,4928	После лечения After treatment
Биосинтез <i>de novo</i> пиримидиндезоксирибонуклеотидов III Pyrimidine deoxyribonucleotides <i>de novo</i> biosynthesis III	0,00433	0,4928	После лечения After treatment
Биосинтез СМР-легионамината I CMP-legionaminat biosynthesis I	0,00584	0,4928	После лечения After treatment
Биосинтез уридин-5'-монофосфат III UMP biosynthesis III	0,00603	0,4928	После лечения After treatment
Дегградация 5'-дезоксиаденозина II 5'-deoxyadenosine degradation II	0,00826	0,4928	После лечения After treatment
Путь биосинтеза L-цистеина (грибы) Superpathway of L-cysteine biosynthesis (fungi)	0,00837	0,4928	После лечения After treatment
Пентозофосфатный путь (неокислительная ветвь) II Pentose phosphate pathway (non-oxidative branch) II	0,01010	0,5206	До лечения Before treatment
Биосинтез строительных блоков O-антигена (<i>E. coli</i>) O-antigen building blocks biosynthesis (<i>E. coli</i>)	0,01787	0,6619	После лечения After treatment
Путь биосинтеза ароматических аминокислот Superpathway of aromatic amino acid biosynthesis	0,01787	0,6619	После лечения After treatment
Путь биосинтеза L-метионина (путем сульфгидрилирования) Superpathway of L-methionine biosynthesis (by sulfhydrylation)	0,02086	0,6619	После лечения After treatment
Биосинтез инозин-5'-фосфата I Inosine-5'-phosphate biosynthesis I	0,02137	0,6619	После лечения After treatment
Дегградация 4-гидроксифенилацетата 4-hydroxyphenylacetate degradation	0,02249	0,6619	После лечения After treatment
Дегградация хондроитинсульфата I (бактериальная) Chondroitin sulfate degradation I (bacterial)	0,02249	0,6619	После лечения After treatment
Бифидобактериальный шунт Bifidobacterium shunt	0,02943	0,6816	После лечения After treatment
Биосинтез 4-амино-2-метил-5-дифосфометилпиримидина II 4-amino-2-methyl-5-diphosphomethylpyrimidine biosynthesis II	0,03266	0,6816	После лечения After treatment
Ассимиляционная сульфатредукция IV Assimilatory sulfate reduction IV	0,03543	0,6816	После лечения After treatment
Биосинтез жирных кислот с анте-изо-разветвленной цепью Ante-iso-branched-chain fatty acid biosynthesis	0,03603	0,6816	После лечения After treatment
Путь гликолиза, пируватдегидрогеназы, ЦТК и обхода глиоксилата Superpathway of glycolysis, pyruvate dehydrogenase, TCA, and glyoxylate bypass	0,03702	0,6816	После лечения After treatment
Гетеролактическая ферментация Heterolactic fermentation	0,03830	0,6816	После лечения After treatment

Метаболические пути Metabolic pathways	P-значение P-value	FDR (Доля ложных открытий) FDR (False discovery rate)	Группа Groups
Биосинтез УДФ-N-ацетилмурамоилпентапептида III (содержащий мезодиаминопимелат) UDP-N-acetylmuramoyl-pentapeptide biosynthesis III (meso-diaminopimelate containing)	0,03838	0,6816	После лечения After treatment
Разложение ацетилен (анаэробное) Acetylene degradation (anaerobic)	0,04082	0,6816	После лечения After treatment
Путь деградации орнитина Superpathway of ornithine degradation	0,04152	0,6816	После лечения After treatment
Путь деградации глюкозы и ксилозы Superpathway of glucose and xylose degradation	0,04152	0,6816	До лечения Before treatment
Редактирование ацилфосфатидилхолина Phosphatidylcholine acyl editing	0,04487	0,6816	После лечения After treatment
Биосинтез УДФ-N-ацетилмурамоилпентапептида I (содержащий мезодиаминопимелат) UDP-N-acetylmuramoyl-pentapeptide biosynthesis I (meso-diaminopimelate containing)	0,04844	0,6816	После лечения After treatment

Сравнение разнообразия не выявило существенных различий микробиомов двух групп больных ТБ: до и после приема антибактериальных препаратов. Полученные нами результаты согласуются с ранее опубликованными данными в которых также было показано или полное отсутствие различий, или временное снижение микробного разнообразия на фоне антибиотикотерапии [16, 27]. Анализируя полученные нами данные, мы можем предположить, что отсутствие снижения альфа- и бета-разнообразия в группе больных ТБ после лечения ПТП можно охарактеризовать адаптацией кишечного бактериального сообщества к длительному приему противотуберкулезных препаратов и установлению альтернативного бактериального состава кишечника. Причем, стоит отметить, что возможно в первые недели лечения ТБ в кишечном микробиоме больных действительно происходило существенное снижение биоразнообразия, а также наблюдались сильные флуктуации бактериального состава. Подтверждением данного факта являются исследования, которые продемонстрировали резкое снижение биоразнообразия бактерий в первые две недели приема ПТП [12, 16]. Однако, впоследствии наблюдаемое снижение видового разнообразия восстанавливалось.

Детальный анализ бактериального состава кишечного микробиома больных ТБ выявил существенные сдвиги в микробиоме кишечника больных ТБ на фоне приема ПТП первого ряда (изониазид, рифампицин, этамбутол, пипразинамид). Одним из самых видимых изменений, регистрируемых на уровне филума, является статистически значимое увеличение *Actinobacteria* (в особенности *Bifidobacterium*). Стоит напомнить, что большинство используемых сегодня антибиотиков берут свое на-

чало от актинобактерий, причем почти 80% антибактериальных препаратов были получены из почвенных бактерий рода *Streptomyces (Actinobacteria)* [2]. Бифидобактерии же во многом ассоциируются с положительным эффектом на здоровье человека и часто используются в виде пробиотических продуктов [17]. Однако в последние годы накапливаются данные, указывающие на наличие генетических детерминант устойчивости в геноме *Bifidobacteria* [8, 10]. По этой причине вполне вероятно, что длительный курс ХТ может способствовать отбору бактерий рода *Bifidobacteria (Actinobacteria)*, которые могут выступать резервуаром генов антибиотикоустойчивости и, возможно, участвовать в горизонтальном переносе генов.

Попарное сравнение метагеномных данных больных ТБ выявило 28 дифференциально представленных таксонов бактерий, 25 из которых достоверно чаще встречались в группе больных ТБ до лечения. Многие обнаруженные в микробиоме больных ТБ до начала лечения бактерии являются представителями нормофлоры пищеварительного тракта человека. Однако чрезмерный рост этих бактерий может способствовать развитию и поддержанию воспалительных процессов в кишечнике, что, в свою очередь, может негативно сказаться на течение туберкулезного процесса [7, 11, 13, 19].

Интересно, что бактерии, представленные в кишечном микробиоме больных ТБ после лечения (*Bacteroides cellulosilyticus*, *Enterocloster aldenensis*, *Clostridium spiroforme*), в целом характеризуются патологическим действием на организм хозяина. Так, *C. spiroforme*, обнаруженный в кишечнике больных ТБ после ХТ, продуцирует энтеротоксин CST, основное повреждающее действие которого заключается в нарушении организации актинового цитоскелета клетки [18, 22].

Установлено, что данный токсин вызывает изменения в системе микротрубочек с образованием выпячиваний, которые расширяют клеточную поверхность, что, в свою очередь, способствует адгезии бактерий и облегчает колонизацию кишечника [22].

О другой дифференциально представленной бактерии *E. aldensis*, ранее *Clostridium aldenense*, крайне мало информации. Известно, что данный вид бактерий часто выделяют из клинических изолятов больных инфекционными заболеваниями [24]. Кроме того, недавно было показано, что геном *Enterocloster* spp. содержит профаги иновируса (семейство *Inoviridae*) [5]. Иновирусы, согласно литературным данным, могут давать преимущество своему бактериальному хозяину, влияя на такие биологические процессы, как подвижность хозяина, динамика роста, образование биопленок, вирулентность, уклонение от иммунитета и секреция токсинов [5, 15].

Существенное увеличение доли *B. cellulolyticus* в микробиоме больных ТБ после ХТ может быть связано с наличием в их геноме детерминант устойчивости. Многие представители рода *Bacteroides*, к которым относится *B. cellulolyticus*, демонстрируют самые высокие показатели устойчивости к антибиотикам среди всех анаэробных патогенов [25]. Эти бактерии обладают повышенной устойчивостью ко многим антибиотикам, включая цефокситин, клиндамицин, метронидазол, карбапенемы и фторхинолоны [23]. Наличие в их геноме различных детерминант устойчивости и патогенности дает колоссальное преимущество их хозяевам в захвате освободившейся экологической ниши, например, вследствие длительной антибактериальной терапии.

Анализ метаболического профиля кишечного микробиома больных ТБ показал, что изменения в структуре кишечного сообщества больных туберкулезом сопровождаются сильными сдвигами в метаболических процессах. В первую очередь, несмотря на ухудшение условий обитания, вызванное приемом антибактериальных препаратов, кишечная микробиота больных ТБ демонстрирует усиление метаболических процессов, направленных на рост и деление микробных клеток. Одним из важных ресурсов для роста бактерий является железо. Анализируя метаболические пути кишечного микробиома больных ТБ после лечения мы можем констатировать усиление биохимических процессов синтеза гема в бактерий. Железо, как известно, является важным микроэлементом, участвующим во множестве клеточных функций: аэробном и анаэробном дыхании, переносе электронов, огромном количестве биохимических превращений и ра-

боте ферментов (цитохром P450, каталаза, пероксидаза и др.) [9]. Проще говоря, железо имеет решающее значение для репликации и выживания почти всех бактерий (исключение — *Lactobacillus* и *Borrelia*). Поэтому одной из стратегий выживания на фоне антибиотикотерапии является борьба за данный микроэлемент, который становится главным лимитирующим фактором роста и размножения.

Другая важная стратегия, используемая условно-патогенной флорой для получения преимущества в росте, заключается в способе получения энергии. Анализ метаболических процессов, представленных в микробиоме как больных ТБ до лечения, так и больных после прохождения ХТ, демонстрирует усиление процессов, направленных на получение энергии из простых углеводов. В норме, как известно, простые сахара в основном всасываются в тонком кишечнике человека, тогда как микробиота толстого кишечника профилирована на переваривание сложных углеводов (клетчатка из растительной пищи или сложные полисахариды, полученные из организма хозяина [муцин]). Более широкая представленность вышеуказанных метаболических путей получения энергии из простых сахаров, по-видимому, указывает на более высокую, чем обычно, доступность глюкозы в толстой кишке больного ТБ, что способствует переключению метаболизма на эти метаболические программы [28]. Источник более высокой доступности глюкозы в кишечнике больных ТБ не ясен. Однако усиление процессов гликолиза и ферментации лактата может косвенно свидетельствовать об изменениях в бактериальной структуре микробиома. В частности, это может говорить о снижении ранее доминирующих обитателей толстой кишки, предпочитавших расщеплять полисахариды, и об увеличении доли бактерий (*Bifidobacteria*, *C. spiroforme*, *E. aldensis*), обладающих ферментными системами катаболизма как простых, так и сложных углеводов.

Проведенное исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, небольшой объем выборки. Во-вторых, взятие фекалий в каждой точке исследования осуществлялось однократно, что также может рассматриваться как ограничение исследования. В-третьих, не учитывались другие переменные, которые также могут оказать влияние на состояние микробиоты кишечника (например, прием алкоголя, курение и др.).

Таким образом, длительный многокомпонентный режим лечения ТБ не нарушает общего разнообразия микробиома кишечника, однако способствует изменениям в структуре бактериального сообщества и метаболическом профиле кишечного микробиома. Применение антибиотиков вызывает дисбиоз, то есть на-

рушение нормального состава и функций кишечной микрофлоры. В первую очередь это характеризуется разрастанием устойчивой к действию антибактериальных препаратов флоры. Анализ метаболического профиля микробиома кишечника больных ТБ демонстрирует активный рост и размножение большого количества бактерий, где основным лимитирующим фактором выступает железо. Кроме того, важно отметить превалирование гликолиза и ферментации лактата как основных способов получения

энергии кишечной микробиотой. Таким образом, результаты нашего исследования подтверждают влияние противотуберкулезных препаратов на микробиоту толстого кишечника и указывают на необходимость дальнейших исследований в данном направлении.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Список литературы/References

- Arrieta M.C., Arevalo A., Stiemsma L., Dimitriu P., Chico M.E., Loores S., Vaca M., Boutin R., Morien E., Jin M., Turvey S.E., Walter J., Parfrey L., Cooper P.J., Finlay B. Associations between infant fungal and bacterial dysbiosis and childhood atopic wheeze in a nonindustrialized setting. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2018, vol. 142, no. 2, pp. 424–434.e10. doi: 10.1016/j.jaci.2017.08.041
- Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Meier-Kolthoff J.P., Klenk H.P., Clement C., Ouhdouch Y., van Wezel G.P. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2015, vol. 80, no. 1, pp. 1–43. doi: 10.1128/MMBR.00019-15
- Blanco-Miguez A., Beghini F., Cumbo F., McIver L.J., Thompson K.N., Zolfo M., Manghi P., Dubois L., Huang K.D., Maltez A.T., Nickols W.A., Piccinno G., Piperni E., Punčochář M., Valles-Colomer M., Tett A., Giordano F., Davies R., Wolf G., Berry S.E., Spector T.D., Franzosa E.A., Pasolli E., Asnicar F., Huttenhower C., Segata N. Extending and improving metagenomic taxonomic profiling with uncharacterized species using MetaPhlan 4. *Nat. Biotechnol.*, 2023. doi: 10.1038/s41587-023-01688-w
- Brennan P.J., Young D.B., Robertson B.D., Andersen P., Barry III C.E., Britton W. Handbook of anti-tuberculosis agents. Introduction. *Tuberculosis*, 2008, vol. 88, no. 2, pp. 85–86. doi: 10.1016/S1472-9792(08)70002-7
- Burckhardt J.C., Chong D.H.Y., Pett N., Tropini C. Gut commensal Enterocloster species host inoviruses that are secreted in vitro and in vivo. *Microbiome*, 2023, vol. 11, no. 1: 65. doi: 10.1186/s40168-023-01496-z
- Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 2018, vol. 34, no. 17, pp. i884–i890. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560
- Elias-Oliveira J., Leite J.A., Pereira I.S., Guimaraes J.B., Manso G.M.D.C., Silva J.S., Tostes R.C., Carlos D. NLR and intestinal dysbiosis-associated inflammatory illness: drivers or dampers? *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11: 1810. doi: 10.3389/fimmu.2020.01810
- Esaiassen E., Hjerde E., Cavanagh J.P., Simonsen G.S., Klingenberg C.; Norwegian Study Group on Invasive Bifidobacterial Infections. Bifidobacterium bacteremia: clinical characteristics and a genomic approach to assess pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.*, 2017, vol. 55, no. 7, pp. 2234–2248. doi: 10.1128/JCM.00150-17
- Frankenberger N., Moser J., Jahn D. Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, vol. 63, no. 2, pp. 115–127. doi: 10.1007/s00253-003-1432-2
- Gueimonde M., Arbolea S. Resistance of Bifidobacteria toward antibiotics. *Methods Mol. Biol.*, 2021, vol. 2278, pp. 195–208. doi: 10.1007/978-1-0716-1274-3_16
- Guo P., Zhang K., Ma X., He P. Clostridium species as probiotics: potentials and challenges. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 2020, vol. 11: 24. doi: 10.1186/s40104-019-0402-1
- Hu Y., Yang Q., Liu B., Dong J., Sun L., Zhu Y., Su H., Yang J., Yang F., Chen X., Jin Q. Gut microbiota associated with pulmonary tuberculosis and dysbiosis caused by anti-tuberculosis drugs. *J. Infect.*, 2019, vol. 78, no. 2, pp. 317–322. doi: 10.1016/j.jinf.2018.08.006
- Kamada N., Chen G.Y., Inohara N., Nunez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat. Immunol.*, 2013, vol. 14, no. 7, pp. 685–690. doi: 10.1038/ni.2608
- Korten V., Murray B.E. Impact of the fluoroquinolones on gastrointestinal flora. *Drugs*, 1993, vol. 45, suppl. 3, pp. 125–133. doi: 10.2165/00003495-199300453-00021
- Mai-Prochnow A., Hui J.G.K., Kjelleberg S., Rakonjac J., McDougald D., Rice S.A. Big things in small packages: the genetics of filamentous phage and effects on fitness of their host. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2015, vol. 39, no. 4, pp. 465–487. doi: 10.1093/femsre/fuu007
- Namasivayam S., Maiga M., Yuan W., Thovarai V., Costa D.L., Mittereder L.R., Wiperman M.F., Glickman M.S., Dzutsev A., Trinchieri G., Sher A. Longitudinal profiling reveals a persistent intestinal dysbiosis triggered by conventional anti-tuberculosis therapy. *Microbiome*, 2017, vol. 5, no. 1: 71. doi: 10.1186/s40168-017-0286-2
- Saarela M., Matto J., Mattila-Sandholm T. Safety aspects of Lactobacillus and Bifidobacterium species originating from human oro-gastrointestinal tract or from probiotic products. *Microb. Ecol. Health. Dis.*, 2002, vol. 14, no. 4, pp. 234–241. doi: 10.1080/08910600310002127
- Schaechter M. Encyclopedia of Microbiology (3rd ed.). Oxford, San Diego: Academic Press, 2009. 4600 p.
- Seishima J., Iida N., Kitamura K., Yutani M., Wang Z., Seki A., Yamashita T., Sakai Y., Honda M., Yamashita T., Kagaya T., Shiota Y., Fujinaga Y., Mizukoshi E., Kaneko S. Gut-derived Enterococcus faecium from ulcerative colitis patients promotes colitis in a genetically susceptible mouse host. *Genome Biol.*, 2019, vol. 20, no. 1: 252. doi: 10.1186/s13059-019-1879-9
- Suzek B.E., Wang Y., Huang H., McGarvey P.B., Wu C.H., UniProt Consortium. UniRef clusters: a comprehensive and scalable alternative for improving sequence similarity searches. *Bioinformatics*, 2015, vol. 31, no. 6, pp. 926–932. doi: 10.1093/bioinformatics/btu739
- Trompette A., Gollwitzer E.S., Yadava K., Sichelstiel A.K., Sprenger N., Ngom-Bru C., Blanchard C., Junt T., Nicod L.P., Harris N.L., Marsland B.J. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.*, 2014, vol. 20, no. 2, pp. 159–166. doi: 10.1038/nm.3444

22. Uzal F.A., Navarro M.A., Li J., Freedman J.C., Shrestha A., McClane B.A. Comparative pathogenesis of enteric clostridial infections in humans and animals. *Anaerobe*, 2018, vol. 53, pp. 11–20. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.06.002
23. Veloo A.C.M., Baas W.H., Haan F.J., Coco J., Rossen J.W. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Bacteroides* spp. and *Prevotella* spp. Dutch clinical isolates. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2019, vol. 25, no. 9, pp. 1156.e9–1156.e13. doi: 10.1016/j.cmi.2019.02.017
24. Warren Y.A., Tyrrell K.L., Citron D.M., Goldstein E.J.C. *Clostridium aldenense* sp. nov. and *Clostridium citroniae* sp. nov. isolated from human clinical infections. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 7, pp. 2416–2422. doi: 10.1128/JCM.00116-06
25. Wexler H.M. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2007, vol. 20, no. 4, pp. 593–621. doi: 10.1128/cmr.00008-07
26. Wingett S.W., Andrews S. FastQ Screen: a tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research*, 2018, vol. 7: 1338. doi: 10.12688/f1000research.15931.2
27. Whipperman M.F., Fitzgerald D.W., Juste M.A.J., Taur Y., Namasivayam S., Sher A., Bean J.M., Bucci V., Glickman M.S. Antibiotic treatment for tuberculosis induces a profound dysbiosis of the microbiome that persists long after therapy is completed. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1: 10767. doi: 10.1038/s41598-017-10346-6
28. Wolfe A.J. Glycolysis for microbiome generation. *Microbiol. Spectr.*, 2015, vol. 3, no. 3: 10.1128/microbiolspec.MBP-0014-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MBP-0014-2014

Авторы:

Юнусбаева М.М., к.б.н., старший научный сотрудник химико-биологического кластера ФГАОУ ВО Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

Терентьева Д.Р., инженер химико-биологического кластера ФГАОУ ВО Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия; младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Бородина Л.Я., врач-фтизиатр высшей категории, зам. главного врача по организационно-методической работе ГБУЗ Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер, г. Уфа, Россия;

Закирова А.М., врач-фтизиатр, зав. кабинетом мониторинга туберкулеза ГБУЗ Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер, г. Уфа, Россия;

Булатов Ш.Э., к.м.н., главный врач ГБУЗ Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер, г. Уфа, Россия;

Билалов Ф.С., д.м.н., главный врач ГБУЗ Республиканский медико-генетический центр, г. Уфа, Россия; доцент кафедры лабораторной диагностики ИДПО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия;

Юнусбаев Б.Б., к.б.н., старший научный сотрудник, доцент ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Yunusbaeva M.M., PhD (Biology), Senior Researcher, ChemBio Cluster, ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation;

Terentyeva D.R., Engineer, ChemBio Cluster, ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation; Junior Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Borodina L.Ya., Phthisiologist, Deputy Chief Physician for Organizational and Methodological Work, Republican Clinical Antituberculous Dispensary, Ufa, Russian Federation;

Zakirova A.M., Head of the Tuberculosis Monitoring Office, Republican Clinical Antituberculous Dispensary, Ufa, Russian Federation;

Bulatov S.E., PhD (Medicine), Head Physician, Republican Clinical Antituberculous Dispensary, Ufa, Russian Federation;

Bilalov F.S., DSc (Medicine), Head Physician, Republican Medical Genetics Center, Ufa, Russian Federation; Assistant Professor, Department of Laboratory Diagnostics, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;

Yunusbayev B.B., PhD (Biology), Senior Researcher, Associate Professor, St. Petersburg State University, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.10.2023
Отправлена на доработку 14.10.2023
Принята к печати 18.10.2023

Received 04.10.2023
Revision received 14.10.2023
Accepted 18.10.2023

MONITORING OF CORONAVIRUS INFECTION IN THE KYRGYZ POPULATION

A.Yu. Popova^a, V.S. Smirnov^b, O.T. Kasymov^c, S.A. Egorova^b, Z.S. Nurmatov^c,
I.V. Drozd^c, A.M. Milichkina^b, V.Yu. Smolenski^a, Z.N. Nuridinova^c, V.A. Ivanov^b,
G.Z. Sattarova^c, E.S. Ramsay^b, B.I. Dzhangaziev^d, E.V. Zueva^b, U.U. Arabiy^e,
V.G. Drobyshevskaya^b, O.B. Zhimbaeva^b, A.P. Razumovskaya^b, A.A. Totolian^b

^a Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation

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

^c National Institute of Public Health, Kyrgyz Ministry of Health, Bishkek, Kyrgyz Republic

^d Kyrgyz Ministry of Health, Bishkek, Kyrgyz Republic

^e National Center for Immunoprophylaxis, Kyrgyz Ministry of Health, Bishkek, Kyrgyz Republic

Abstract. Purpose of the study: to study the dynamics of developing herd immunity against SARS-CoV-2 in the population of the Republic of Kyrgyzstan during COVID-19. *Materials and methods.* The work was carried out using the methodology for assessing population immunity developed by Rospotrebnadzor (Russia) as well as the Ministry of Health (Kyrgyzstan) and the St. Petersburg Pasteur Institute. The selection of participants was carried out by questionnaire using a cloud (Internet server) service. To monitor population immunity, a cohort of 2421 subjects was formed, who participated in all stages of seromonitoring. Volunteers were randomized according to age groups (1–17, 18–29, 30–39, 40–49, 50–59, 60–69, 70+ years), regional and professional factors. Antibodies (Abs) against SARS-CoV-2 nucleocapsid (Nc) and the receptor binding domain (RBD) of S-glycoprotein were determined by qualitative and quantitative methods. The study was carried out in 3 stages according to a single scheme: 1st stage — 06/28–07/03/2021, 2nd — 21–25/02/2022 and 3rd — 31/10–04/11/2022. Since 2021, Kyrgyzstan has been vaccinating the population against SARS-CoV-2 mainly using inactivated whole-virion vaccines. *Results.* Population immunity against SARS-CoV-2 was predominantly accounted for by both Ab types (Nc⁺RBD⁺). By the 3rd stage, the percentage of such persons reached 99.2%, Nc⁻RBD⁻ volunteers — up to 0.8%. At the 1st stage, middle-aged people dominated, but age differences were leveled out by the 2nd stage. The greatest impact on seroprevalence was found among medical workers, the smallest — among businessmen and industrial workers. Populational vaccination significantly impacted on the state of herd immunity that reached 25% by the 3rd stage. The refusals of the population in Kyrgyz Republic from vaccination noted at the 2nd and especially 3rd stages did not significantly affect level of herd immunity, which could probably be associated with asymptomatic cases of COVID-19, against which primary vaccination had a booster effect. *Conclusion.* The dynamics of population humoral immunity against SARS-CoV-2 included a number of changes in the level of circulating antibodies (Nc, RBD), caused by both primary infection and vaccination. The herd immunity formed in population of Kyrgyzstan allowed to reduce the incidence of COVID-19 to almost sporadic level.

Key words: Kyrgyz Republic, population, SARS-CoV-2, COVID-19, seromonitoring, herd immunity, antibodies, nucleocapsid, receptor binding domain, vaccination, hybrid immunity.

Адрес для переписки:

Смирнов Вячеслав Сергеевич
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.
Тел.: 8 911 948-29-22. E-mail: vssmi@mail.ru

Contacts:

Vyacheslav S. Smirnov
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 911 948-29-22. E-mail: vssmi@mail.ru

Для цитирования:

Попова А.Ю., Смирнов И.С., Касымов О.Т., Егорова С.А., Нурматов З.С.,
Дрозд И.В., Миличкина А.М., Смоленский В.Ю., Нуридинова З.Н.,
Иванов В.А., Саттарова Г.З., Рэмзи Э.С., Джангазиев В.И., Зуева Е.И.,
Араби У.У., Дробышевская В.Г., Жимбаева О.В., Разумовская А.П.,
Петрова О.А., Тотолян А.А. Мониторинг коронавирусной инфекции
в киргизской популяции // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6.
С. 1089–1108. doi: 10.15789/2220-7619-MOC-17531

Citation:

Popova A.Yu., Smirnov V.S., Kasymov O.T., Egorova S.A., Nurmatov Z.S.,
Drozd I.V., Milichkina A.M., Smolenski V.Yu., Nuridinova Z.N., Ivanov V.A.,
Sattarova G.Z., Ramsay E.S., Dzhangaziev B.I., Zueva E.V., Arabiy U.U.,
Drobyshevskaya V.G., Zhimbaeva O.B., Razumovskaya A.P., Totolian A.A.
Monitoring of coronavirus infection in the Kyrgyz population // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13,
no. 6, pp. 1089–1108. doi: 10.15789/2220-7619-MOC-17531

The study was conducted within the framework of a Rospotrebnadzor program with the support of the Russian government (Order No. 1658-r dated June 18, 2021 "On financial activities to assist the countries of Eastern Europe, Transcaucasia and Central Asia in assessing collective immunity to novel coronavirus infection and sequencing COVID-19 strains in 2021–2022").

МОНИТОРИНГ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В КИРГИЗСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Попова А.Ю.¹, Смирнов И.С.², Касымов О.Т.³, Егорова С.А.², Нурматов З.С.³, Дрозд И.В.², Миличкина А.М.², Смоленский В.Ю.¹, Нуридинова З.Н.³, Иванов В.А.², Саттарова Г.З.³, Рэмзи Э.С.², Джангазиев В.И.⁴, Зуева Е.И.², Араби У.У.⁵, Дробышевская В.Г.², Жимбаева О.В.², Разумовская А.П.², Петрова О.А.², Тотолян А.А.²

¹ Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия

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

³ НПО «Профилактическая медицина» Министерства здравоохранения и социального развития, Бишкек, Кыргызская Республика

⁴ Министерство здравоохранения и социального развития, Бишкек, Кыргызская Республика

⁵ Национальный центр иммунопрофилактики Министерства здравоохранения и социального развития, Бишкек, Кыргызская Республика

Резюме. Цель исследования: изучить динамику формирования популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 у населения Республики Кыргызстан на фоне COVID-19. *Материалы и методы.* Работа проведена по методике оценки популяционного иммунитета, разработанной Роспотребнадзором (Россия) и Министерством здравоохранения (Кыргызстан) и Санкт-Петербургским институтом им Пастера. Подбор участников осуществлялся анкетным опросом с использованием облачного (Интернет-сервера) сервиса. Для мониторинга популяционного иммунитета сформирована когорта из 2421 человек, участвовавшая во всех этапах серомониторинга. Добровольцы были рандомизированы по возрастным группам (1–17, 18–29, 30–39, 40–49, 50–59, 60–69, 70+ лет), региональным и профессиональным факторам. Антитела (Abs) к нуклеокапсиду (Nc) и рецептор-связывающему домену (RBD) S-гликопротеина определяли качественным и количественным методами. Исследование проводилось в 3 этапа по единой схеме: I этап — 28.06–03.07.2021 г., II этап — 21–25.02.2022 г. и III этап — 31.10–04.11.2022 г. С 2021 г. в Кыргызстане проводили вакцинацию населения против SARS-CoV-2 преимущественно инактивированными цельновирионными вакцинами. *Результаты.* Популяционный иммунитет населения к SARS-CoV-CoV-2 преимущественно был обусловлен обоими Abs (Nc⁺RBD⁺). К III этапу доля таких лиц достигла 99,2%, доля Nc⁻RBD⁻ волонтеров до 0,8%. На I этапе доминировали лица среднего возраста, однако возрастные различия нивелировались ко II этапу. Наибольшее влияние на серопревалентность выявлено среди медицинских работников, наименьшее — среди бизнесменов и промышленных рабочих. Значимое влияние на состояние популяционного иммунитета оказала вакцинация населения, охват которой к III этапу достиг 25%. Отмеченные на II и особенно III этапе отказы населения от вакцинации существенно не повлияли на уровень популяционного иммунитета, что, вероятно, могло быть связано с бессимптомными случаями COVID-19, на фоне которой первичная вакцинация оказывала бустерный эффект. *Заключение.* Динамика популяционного гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 включала в себя ряд изменений уровней циркулирующих антител (Nc, RBD), обусловленных как первичной инфекцией, так и вакцинацией. Сформированный популяционный иммунитет населения Кыргызстана позволил снизить заболеваемость практически до спорадического уровня.

Ключевые слова: Кыргызская Республика, население, SARS-CoV-2, COVID-19, серомониторинг, коллективный иммунитет, антитела, нуклеокапсид, рецептор-связывающий домен, вакцинация, гибридный иммунитет.

Introduction

Following its first identification in December 2019, coronavirus disease (COVID-19), caused by a new and highly-virulent strain of β -coronavirus (SARS-CoV-2), turned out to be extremely contagious. It spread almost instantly throughout the world, causing more than 686 million cases of manifest infection by April 2023, including 6.8 million fatalities. In this context, the epidemic situation in the Kyrgyz Republic (KR) looks quite optimistic. As of mid-April 2023, 206 849 cases of COVID-19 were identified in the country, amounting to 0.03% of the global level [10]. According to this indicator, the KR occupies 115th place among 189 global countries [9]. As noted in our previous article [26], one factor could be the relatively low population density, amounting to 35.2 km² in 2023 [28]. Regarding density, Kyrgyzstan is in 181st place in the

global ranking of countries prepared by the United Nations [18]. The highest densities were noted in the Osh and Chui regions (38.7 and 49 km², respectively); the lowest was in the Naryn region (5.5 km²) [23].

A second factor affecting COVID-19 incidence could be the climatic and geographical conditions of the country. The Republic is landlocked and surrounded on all sides by territories with mountainous or desert landscapes. Mountainous areas occupy up to 94% of the territory, and 41% of them belong to the harsh highlands located above 3000 m [2, 8]. The climate in these conditions is characterized by a sharply continental character with significant annual temperature fluctuations and low precipitation. In winter, the temperature can vary from +2°C in the valleys (Fergana, Chui valley, Issyk-Kul depression) to –50°C in the highlands of the Inner Tien Shan. The average temperature in summer varies from +27°C (Fergana

Valley) to $+4^{\circ}\text{C}$ in mountainous areas. Annual precipitation is about 1000 mm in the Fergana Valley and 180–250 mm in the mountains of the Central and Inner Tien Shan [8]. The described conditions, combined with low population density, do not contribute to the active spread of infectious diseases [1].

The third factor could be the tactics used in the fight against COVID-19 in the KR. Immediately after the first cases appeared, unprecedented measures were introduced in the Republic to curb the spread of the virus. Thus, already on March 22, 2020, checkpoints were installed throughout the KR, public catering facilities were temporarily closed, and all public events were prohibited. The wearing of masks and maintaining social distancing was encouraged [12]. Since the situation did not improve, on May 25th (2020) a state of emergency was declared in the three largest cities (Bishkek, Osh, Jalal-Abad), a curfew was introduced, educational institutions were closed, and citizens were prohibited from leaving home unless absolutely necessary (i.e., for purchasing food or medicine). These and other activities, consistently carried out by the authorities throughout 2020–2021, helped prevent the uncontrolled spread of SARS-CoV-2 among the population [1, 12].

The result of these measures was a gradual decrease in morbidity (Fig. 1). COVID-19 incidence peaked briefly in weeks 29–30 of 2020, followed by a sharp decline over the next three weeks to near sporadic levels.

In the subsequent period, three more incidence peaks were noted in 2021–2022. They were short-term in nature and, starting from week 35 of 2022,

the number of patients with COVID-19 decreased to a stable, sporadic level.

When analyzing COVID-19 incidence dynamics in the Kyrgyz population, one cannot help but notice a clear connection between the number of cases and the share vaccinated (Fig. 1). Correlation analysis made it possible to identify a stable inverse relationship between the compared data with a correlation coefficient value of -0.68 ($p < 0.0001$). This indicates a statistically significant effect of vaccination on the intensity of the epidemic process. The range of preparations used throughout the epidemic changed due to the availability of certain anti-coronavirus vaccines in the KR. Initially, three vaccines were used: Gam-COVID-Vac (“Sputnik V”, Russia); EpiVacCorona (Russia); and Sinopharm (PRC) [26]. Subsequently, an entire range of vaccines supplied to the Republic was used.

In addition, the protective contribution of post-infectious immunity, formed in response to manifest COVID-19 or asymptomatic infections, cannot be underestimated. It is generally accepted that following an initial infection, a primary immune response is formed in the body, yet it most often decreases relatively quickly. This subsidence can be overcome by repeated infection with a pathogenic virus, especially as a result of contact with a convalescent or even a vaccinated subject with a mutated version of the virus [5, 14, 33, 37]. One possible way to reduce the risk of reinfection is re-vaccination after previous illness or asymptomatic infection. Booster administration of vector or mRNA vaccines to indi-

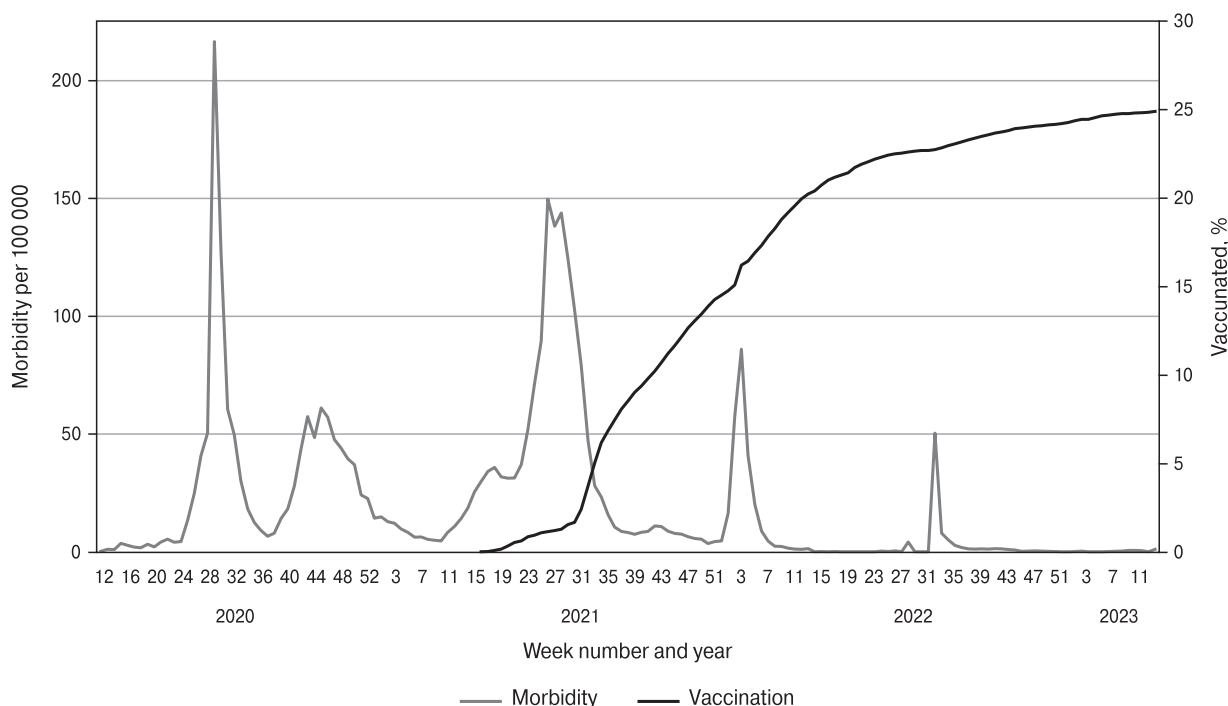


Figure 1. Dynamics of COVID-19 incidence and vaccination in the Kyrgyz population

Note. Grey line — incidence rates throughout the COVID-19 epidemic among the Kyrgyz population; black line — the share of people who completed vaccination (%); left vertical axis — the number of patients per 100 000 population; right vertical axis — share of individuals who fully completed vaccination; horizontal axis — week numbers of the year.

viduals with a history of infection has been shown to produce higher levels of total and neutralizing antibodies compared to fully-vaccinated individuals who have received two doses of vaccine but have no prior overt or asymptomatic infection [5]. Such approaches contribute to the formation of hybrid immunity, featuring the most effective protection [6, 11, 24, 31]. Since, as noted above, the vaccination tactics adopted in the KR led to a decrease in incidence to a sporadic level (Fig. 1), it can be assumed that the driving mechanism for this result was most likely hybrid immunity.

The study summarizes a two-year project, the goal of which was to analyze the formation of collective immunity against coronavirus, and its associated dynamics, among the Kyrgyz population throughout the COVID-19 epidemic.

Table 1. Distribution of volunteers by age

Age interval, years	N	%
1–17	123	5.1 (4.3–6.1)
18–29	223	9.2 (8.1–10.5)
30–39	371	15.4 (13.4–16.9)
40–49	525	21.8 (20.2–23.5)
50–59	601	24.9 (23.2–26.7)
60–69	426	17.7 (17.4–19.2)
70+	142	5.8 (4.9–6.8)
Overall	2411	100

Table 2. Distribution of volunteers by place of residence

City or region	N	%
Bishkek City	287	11.9 (7.5–13.3)
Osh Region	262	10.9 (9.6–12.1)
Batken Region	208	8.6 (7.5–9.8)
Jalal-Abad Region	554	23.0 (21.3–24.7)
Talas Region	334	13.8 (10.7–15.3)
Issyk-Kul Region	266	11.0 (9.8–12.4)
Naryn Region	337	13.8 (10.7–15.2)
Chui Region	163	6.8 (5.8–7.8)
Overall	2411	100

Table 3. Distribution of volunteers by occupation

Occupation	N	% (95% CI)
Healthcare	1393	57.8 (55.8–59.7)
Science, education, the arts	163	6.8 (5.6–7.8)
Business, transport, manufacturing	98	4.1 (3.3–4.9)
Civil servants, office military personnel	198	8.2 (7.2–9.4)
Unemployed	132	5.5 (4.6–6.5)
Pensioners	244	10.1 (8.9–11.4)
Child, pupil, student	105	4.4 (3.6–5.2)
Other	78	3.2 (2.6–4.0)
Overall	2411	100

Materials and methods

Formation and characteristics of the volunteer cohort. The study was conducted as part of the project “Assessment of collective immunity to SARS-CoV-2 in the population of the Kyrgyz Republic”, carried out using a methodology for assessing collective immunity developed by Rospotrebnadzor (Russia) and the St. Petersburg Pasteur Institute (Russia) with the participation of the Kyrgyz Ministry of Health, taking into account WHO recommendations. The longitudinal, randomized cohort study was conducted in 3 stages in the period 2021–2022: 1st stage (28.06–03.07.2021); 2nd stage (21.02–25.02.2022); and 3rd stage (31.10–04.11.2022). Of the 9471 volunteers who participated in 1st stage, only 2411 took part in all 3 survey stages; only these were used to assess the evolution of immunity during the pandemic. The methodology for selecting and randomizing volunteers has been detailed in our previous works [26, 27].

The study adhered to the requirements of the Declaration of Helsinki. In addition, the studies were approved by the ethics committees of the “Preventive Medicine” Scientific and Production Association (currently the National Institute of Public Health, Kyrgyz Ministry of Health) (protocol No. 7, ref. No. 01-288, dated December 9, 2020) and the St. Petersburg Pasteur Institute (protocol No. 64, dated May 26, 2020).

Before the start of the study, all volunteers were stratified by age (Table 1), place of residence (Table 2), and occupation (Table 3). The cohort consisted of 479 men and 1905 women (sex ratio 1:4).

The initial professional categories were heterogeneous, with large groups (medicine, unemployed) and small groups (creativity — 6 people, military personnel — 8 people, etc.). As such, certain subgroups were combined according to similarity of risk factors. The combined groups are shown in Table 3.

Laboratory analysis of volunteer samples. At each stage of the study, venous blood samples were taken from volunteers for quantitative determination by ELISA of antibodies (Abs) to the SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen (Nc) and the receptor binding domain (RBD) of the S (spike) protein. The method for determining Ab levels in peripheral blood plasma, and the diagnostic systems used, are described in detail in a previous work [26].

Volunteer vaccination. Some volunteers, as well as the rest of the Kyrgyz population, received specific vaccine prophylaxis during the survey period. During the first stage, mainly Gam-COVID-Vac vector vaccines (Sputnik V, Sputnik Light, Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russia) and the BBIBP-CorV (Sinopharm, PRC) whole-virion inactivated vaccine were used.

During the implementation of the 2nd and 3rd stages of the study, the entire range of vaccine preparations available to Kyrgyz medical authorities was used: vector vaccine ChAdOx1 S (AstraZeneca),

mRNA preparations BNT162b2 (Pfizer) and mRNA-1273 (Moderna), as well as the whole-virion inactivated vaccines BBIBP-CorV (Sinopharm, PRC), CoronaVac (Sinovac, PRC) and QuazVac (Kazakhstan). Due to the fact that the set of preparations used in the KR included eight different products, they were combined, when necessary, into four groups, based on design platform, for data analysis. These categories were: inactivated (BIBP-Cor-V, CoronaVac, QuazVac); vector (Gam-COVID-Vac, Sputnik V, Sputnik Light, ChAdOx1-S); mRNA (BNT162b2, mRNA-1273); and peptides (EpiVacCorona). The given categories are used during analysis and discussion of the main aspects of vaccination in this article.

Statistical analysis was carried out using Excel 2010. Confidence intervals (95% CI) were calculated by the method of Wald and Wolfowitz [35], with correction as described by Agresti and Coull [4]. The statistical significance of differences in shares was calculated using the z-test [32]. Unless otherwise indicated, differences were designated as significant when $p \leq 0.05$.

Results

SARS-CoV-2 seroprevalence in volunteers of different ages throughout seromonitoring. The main method for assessing collective immunity in the population

was to determine the distribution among volunteers of two specific Abs: anti-Nc and anti-RBD. Based on the results of serological analysis at each stage of the study, the cohort was divided into two groups. The “negative serological group” (NSG) included individuals who did not have circulating Nc or RBD Abs in their blood. The second group, the “combined group of all positives” (CGAP), included volunteers with circulating Abs to Nc, RBD, or both.

In the 1st stage, the share of CGAP individuals averaged 82.0% (95% CI: 80.4–83.5), while the share of NSG was 4.5-fold less, or 18.0% (95% CI: 16.5–19.5). In the 2nd stage, the share of CGAP volunteers increased to 98.2% (95% CI: 97.6–98.7), and NSG decreased to 1.8% (95% CI: 1.3–2.4). Finally, by 3rd stage, the CGAP reached a maximum (99.2%; 95% CI: 98.8–99.5), while NSG decreased to a minimum (0.8%; 95% CI: 0.5–1.2). Age-related differences in seroprevalence were noted only in 1st stage. The lowest seroprevalence was observed in the children’s subgroup (1–17 years), and the maximum was among individuals in the age subgroup of 50–59 years (Fig. 2). By the 2nd and especially the 3rd stages, the differences gradually leveled out to statistically insignificant values.

In addition to cohort distribution according to CGAP and NSG, we assessed the structural distribution of Nc and RBD Abs in volunteers of different age groups. For this, quantitative analysis results for the CGAP group were further refined as subgroups: those

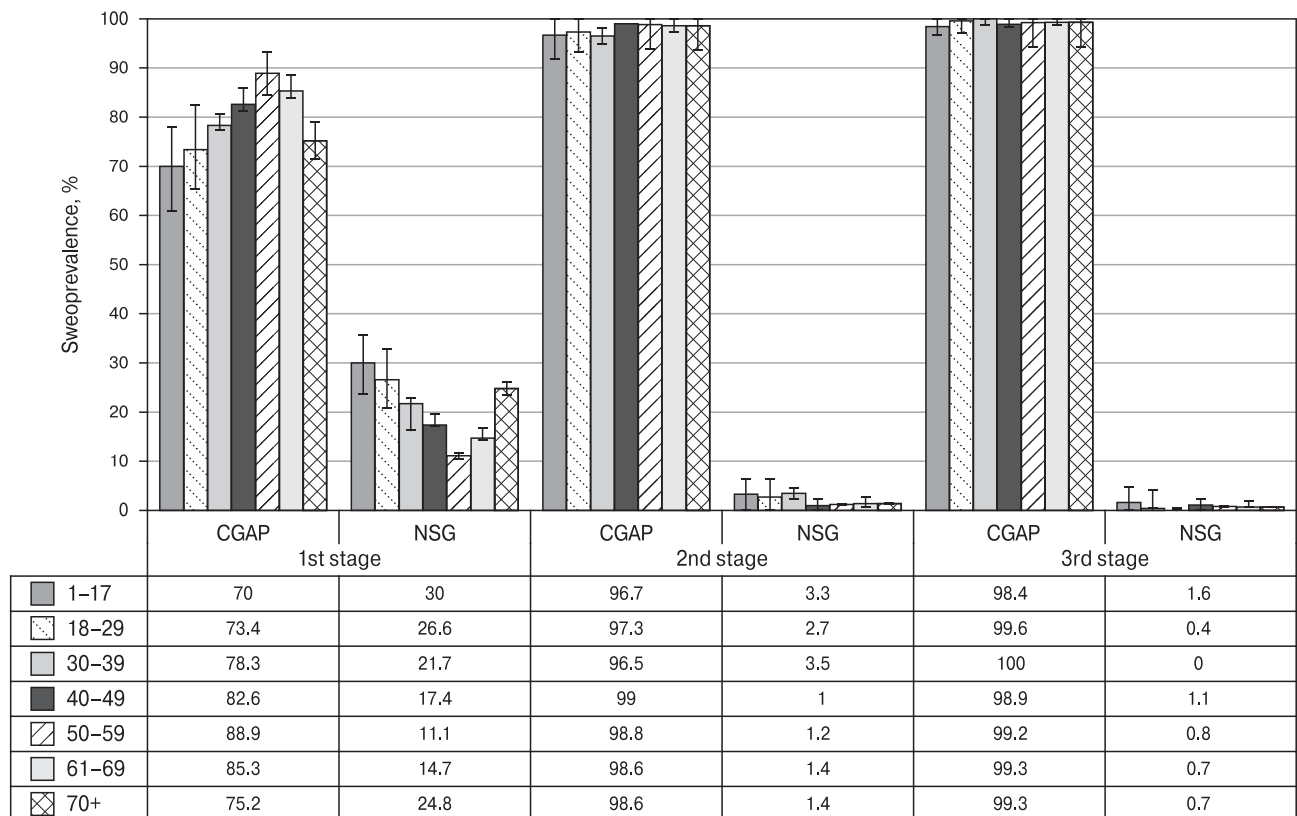


Figure 2. Shares of seropositive (CGAP) and seronegative (NSG) individuals of different ages throughout seromonitoring

with only Nc Abs (Nc⁺RBD⁻); those with only RBD Abs (RBD⁺Nc⁻); and those with both Ab subtypes circulating simultaneously (Nc⁺RBD⁺) (Fig. 3A–C).

In the 1st stage of the study, conducted one and a half years after the start of the pandemic, during the period of decline in the 2nd moderate incidence peak (Fig. 1), seropositive volunteers were predominantly represented by those who had Abs to both antigens (Nc⁺RBD⁺), 51.3% (95% CI: 49.2–53.3) on average. About a quarter of volunteers had antibodies only to RBD (RBD⁺Nc⁻), 26.7% (95% CI: 24.9–28.4). The share of volunteers who had only Nc Abs (Nc⁺RBD⁻) was 4.2% (95% CI: 3.4–5.0).

When analyzing individual age groups in the 1st stage, differences in the structure of immunity were noted. Half of the volunteers over 40 years old were Nc⁺RBD⁺, and slightly more than 20% were RBD⁺Nc⁻. In contrast, volunteer groups from 1 to 39 years old were represented approximately equally (about a third of volunteers) by Nc⁺RBD⁺ and RBD⁺Nc⁻ (Fig. 3A).

By the 2nd stage, carried out in February 2022, incidence remained at a consistently low level, and vaccination coverage approached 20% (Fig. 1). In this context, 88.7% (95% CI: 87.3–89.9) of volunteers on average for the cohort had antibodies to two antigens (Nc⁺RBD⁺). The shares of monopositive individuals decreased: RBD⁺Nc⁻ to 7.8% (95% CI: 6.8–8.9); and Nc⁺RBD⁻ to 1.8% (95% CI: 1.3–2.4). Moreover, age differences practically leveled out. Only among children (1–17 years old), the relatively low share of Nc⁺RBD⁻ remained significantly higher than the group average ($p < 0.0001$).

By the 3rd stage, the share Nc⁺RBD⁺ in the entire cohort continued to be maximal, averaging 88.1% (95% CI: 86.7–92.5). The share of Nc⁺RBD⁻ individuals decreased to almost zero. The share of RBD⁺Nc⁻ subjects increased slightly (compared to 2nd stage) to 10.6% (95% CI: 9.4–11.9). Differences were noted only among volunteers monopositive for RBD (RBD⁺Nc⁻), the shares of which were greatest among those 18–29 years old (17.5%; 95% CI: 12.7–23.1) and 30–39 years old (15.4%; 95% CI: 11.8–19.4), although the differences were not significant for any age group.

SARS-CoV-2 seroprevalence in volunteers living in different Kyrgyz regions throughout seromonitoring. As noted, the KR is a mountainous country located in Central Asia. The geography of the KR is characterized by two mountain systems, the Tien Shan and Pamir, occupying almost 90% of the country. The population mainly lives in intermountain valleys, each of which has its own climatic and geographic features. These, in principle, could have an impact on seroprevalence. Based on these features, we investigated the presence of Nc and RBD Abs among volunteers from the main regions of the Republic. At first, the proportions of seropositive (CGAP) and seronegative (NSG) volunteers were determined in each region (Fig. 4).

In 1st stage, the share of NSG volunteers varied from a maximum in Bishkek (27.6%; 95% CI: 22.7–33.1) to a minimum in the Talas region (11.4%; 95% CI: 8.2–15.3) reaching significance ($p < 0.0001$). Accordingly, the proportion of CGAP subjects in the Talas region was significantly higher than in Bishkek ($p < 0.0001$).

As noted earlier regarding 2nd stage, the share of NSG individuals in the cohort expectedly decreased by an average of 10-fold, to 1.8% (95% CI: 1.3–2.4). Meanwhile, CGAP reached an average of 98.2% (95% CI: 97.6–98.7) for the cohort without any significant differences in volunteer indicators by region.

By the 3rd stage, the share of NSG decreased to an average of 0.8% (95% CI: 0.4–1.2), while the percentage of CGAP volunteers almost reached the maximum possible value, an average of 99.2% for the cohort (95% CI: 98.8–99.6). No regional differences were noted.

In light of the data, especially for 2nd and 3rd stages, it was logical to expect a similar seroprevalence structure of individuals with peripheral Nc Abs, RBD Abs, or both (Nc⁺RBD⁺) (Fig. 5).

As described earlier, in 1st stage, half of the cohort (51.3%; 95% CI: 49.2–53.3) was represented by Nc⁺RBD⁺ individuals (Fig. 5A). The share RBD⁺Nc⁻ averaged 26.6% (95% CI: 24.9–28.4), and the share Nc⁺RBD⁻ did not reach 5% (4.2%; 95% CI: 3.4–5.0).

By 2nd stage, the share Nc⁺RBD⁺ increased to 88.7% (95% CI: 87.3–89.9) due to decreases in monopositive volunteers: Nc⁺RBD⁻ to 1.8% (95% CI: 1.3–2.4); and RBD⁺Nc⁻ to 7.8% (95% CI: 6.8–8.9). The differences were significant at $p < 0.0001$. Furthermore, regional differences in seroprevalence were seen in 1st stage: significantly lower shares of RBD⁺Nc⁻ individuals in the Chui, Issyk-Kul and Jalal-Abad regions; and lower Nc⁺RBD⁺ status in the Batken region and Bishkek (Fig. 5A). By 2nd stage, however, these differences leveled out to an insignificant level (Fig. 5B).

By the 3rd stage, the share of Nc⁺RBD⁺ remained high 88.1% (95% CI: 86.7–92.5), without significant differences (Fig. 5C). However, regional differences in share RBD⁺Nc⁻ increased, specifically: the shares seropositive for RBD increased in the Osh and Jalal-Abad regions; they decreased in the Chui, Issyk-Kul and Naryn regions; and they remained virtually unchanged in other regions. In other words, the differences that existed in the 2nd and 3rd stages of monitoring did not significantly affect the state of collective immunity to SARS-CoV-2, either nationwide or by administrative region.

Influence of occupational factors on the structure of SARS-CoV-2 seropositivity. Occupation could potentially impact SARS-CoV-2 Ab distributions. There is an extensive list of professions that require constant wide contact with the surrounding population. Such specialists include healthcare workers, consumer services, public catering, social workers, etc. [19, 22].

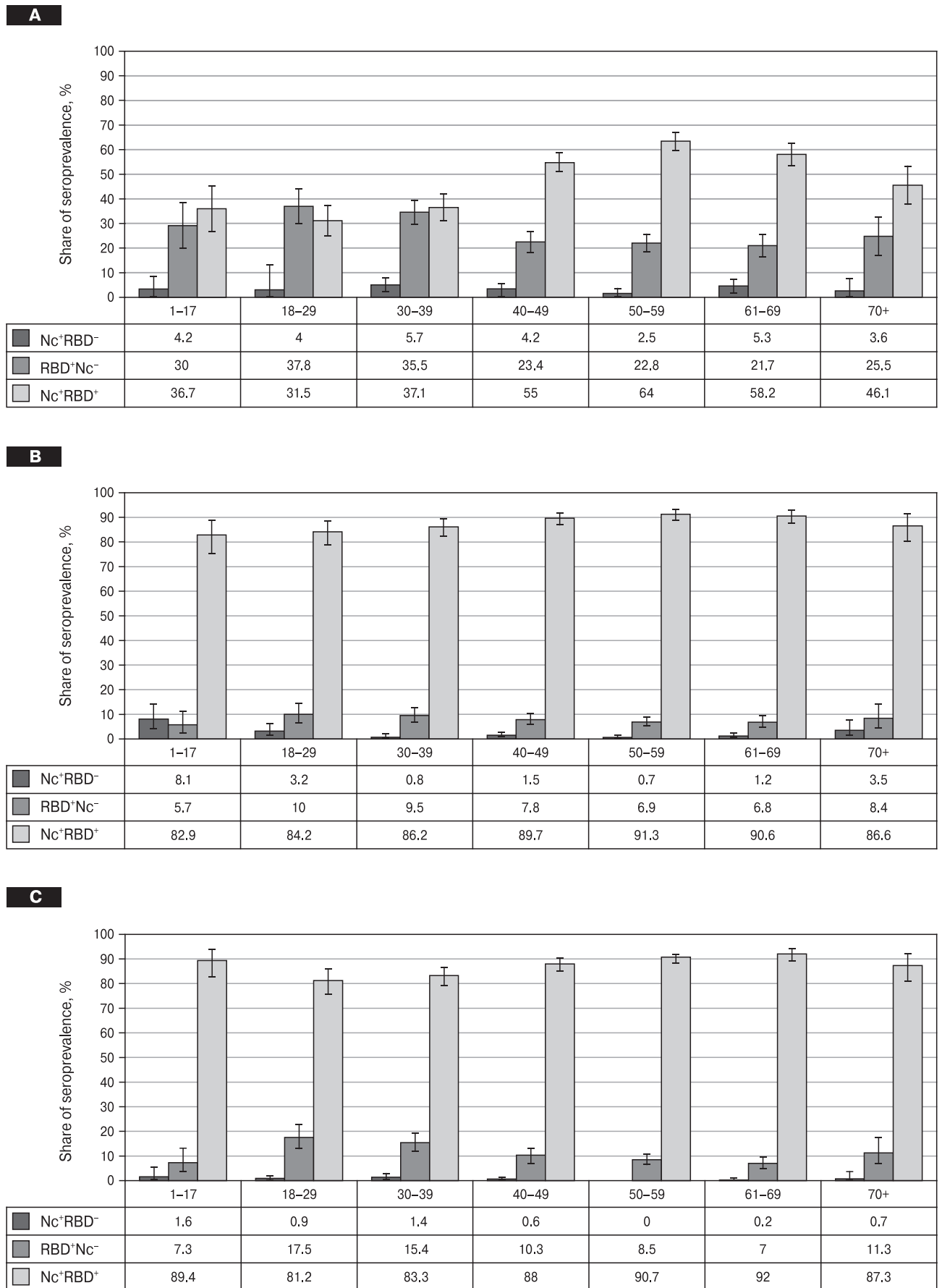


Figure 3. Changes in peripheral Nc and RBD Ab levels in volunteers of different ages throughout seromonitoring
Note. Letters above diagrams: A — 1st stage; B — 2nd stage; C — 3rd stage of the study.

Therefore, the volunteer cohort was stratified by profession. Where sample sizes allowed, homogeneous professional groups were formed (unemployed, healthcare, pensioners). Professional groups with a small number of volunteers were joined into aggregate groups (science + education + the arts, others).

As follows from Fig. 6, the proportion CGAP was highest among healthcare workers in 1st stage ($p < 0.001$). In all other professional groups, the differences in 1st stagedid not reach the threshold of statistical significance. By 2nd stage, all professional differences were practically leveled out, and the share of CGAP volunteers increased to a maximal level, amounting to an average of 98.2% for the cohort (95% CI: 96.7–98.7). By 3rd stage, it was 99.2% (95% CI: 98.9–99.6).

Based on seroprevalence distribution findings in coarse groups (NSG, CGAP), similar patterns would be expected for individual SARS-CoV-2 Ab subtypes. As noted, the CGAP group includes three subgroups of individuals seropositive for one (Nc^+RBD^- , RBD^+Nc^-) or both (Nc^+RBD^+) Ab types. Their ratios determine the structure of humoral immunity to pathogenic coronavirus [41]. Analysis of Ab distributions among those in different professions largely confirmed the previously identified trends (Fig. 7).

The share of Nc^+RBD^+ individuals in all professional groups, as well as the share CGAP, in 1st stage was the smallest among the three stages, ranging from 31.7% (95% CI: 23.0–41.6) in children to 57.4%

(95% CI: 54.8–60.3) among healthcare workers (Fig. 7A). The share RBD^+Nc^- in different professional groups ranged from 23.5% (95% CI: 15.5–33.1) to 33.6% (95% CI: 24.7–43.6). In the 2nd and 3rd stages, the same trend was observed in all professional groups: the share Nc^+RBD^+ increased significantly (exceeding 80%), while the shares of RBD^+Nc^- and Nc^+RBD^- decreased to an average of 10.6% (95% CI: 9.4–11.9) and 0.6% (95% CI: 0.3–1.0) (Fig. 7B, C). It can be assumed that this evolution of seropositivity is probably associated with features of vaccination implemented in the KR during this period.

Quantification of the distribution of major antibodies against SARS-CoV-2 among volunteers during the monitoring process. In addition to determining overall seroprevalence in the population, to assess collective immunity to the pathogenic coronavirus, it is necessary to have an idea of Ab titers in volunteers throughout seromonitoring. To obtain this information, we used the corresponding quantitative ELISA test systems described in previous work [26]. Blood samples were analyzed quantitatively from all volunteers participating in the study. They were stratified only by age which, in our opinion, made it possible to reduce the influence of regional or professional factors on the results obtained. Since the serological study used two kits intended for the quantitative determination of Abs only to Nc or RBD, the results were analyzed separately for each antigen. The results obtained are expressed in BAU/ml.

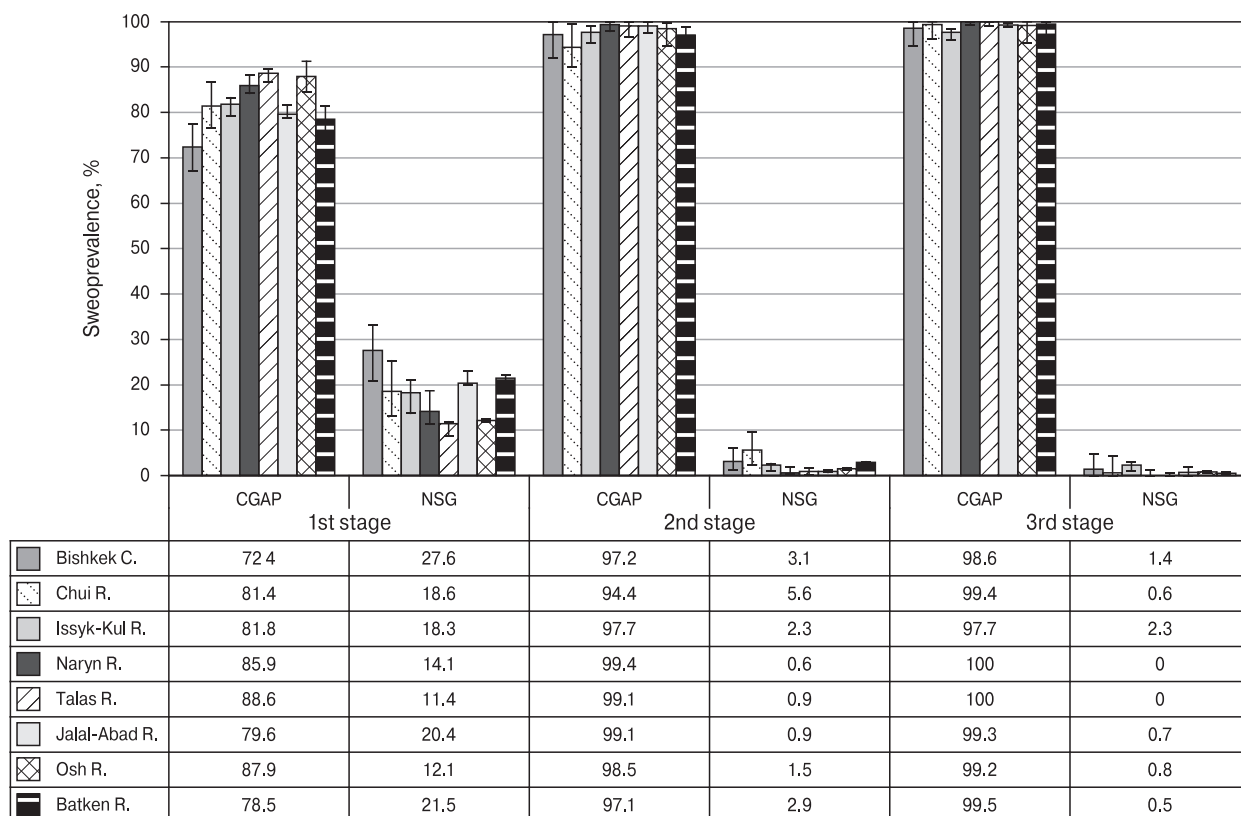


Figure 4. Seropositive (CGAP) and seronegative (NSG) volunteers by Kyrgyz region throughout seromonitoring
Note. C — city; R — region.

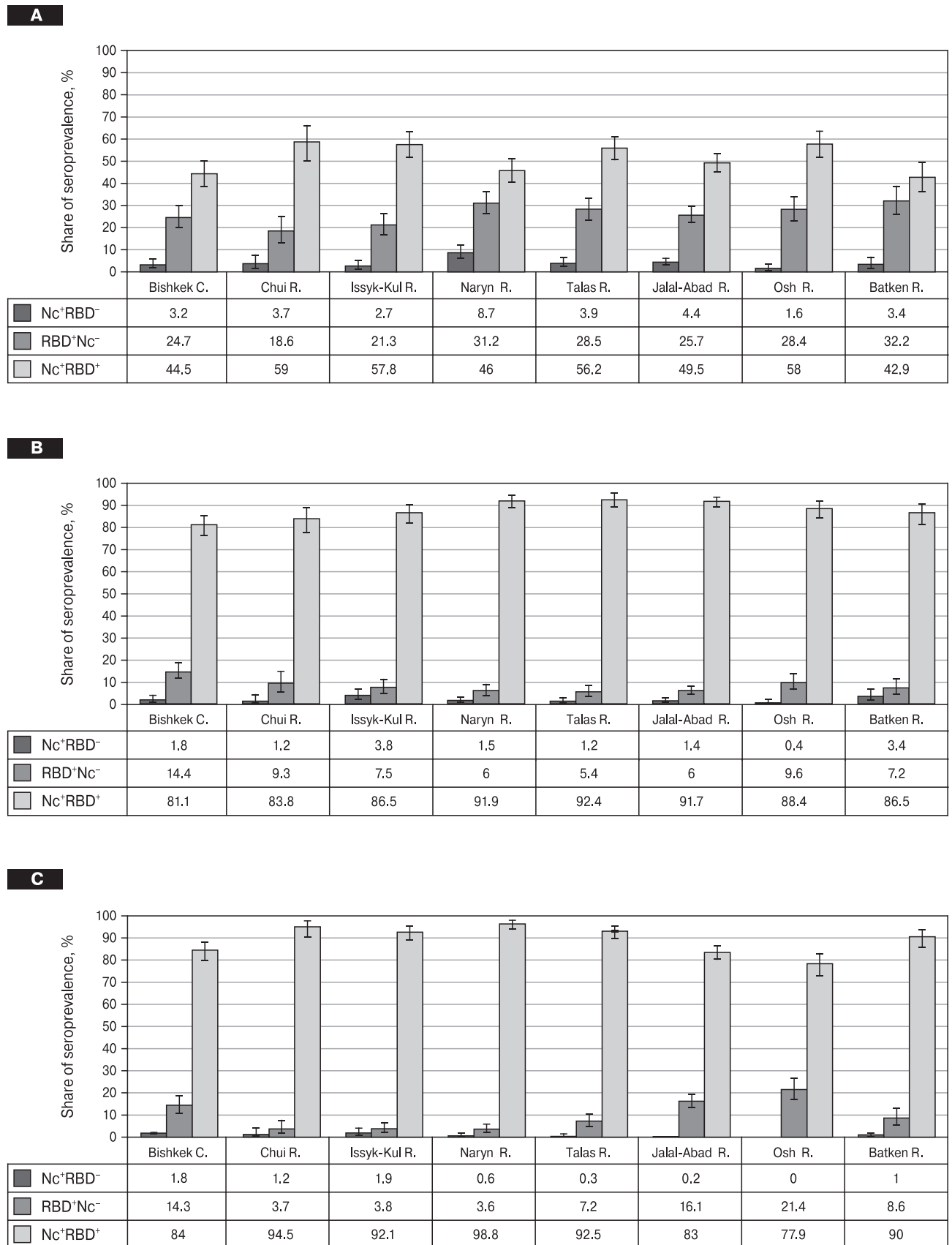


Figure 5. Humoral immunity dynamics (Nc, RBD Abs) among volunteers by Kyrgyz region

Notes. Vertical black lines are 95% confidence intervals. Letters above diagrams: A — 1st stage, B — 2nd stage, C — 3rd stage of analysis. C — city; R — region.

Quantitative Nc Ab levels during seromonitoring in volunteers of different age groups. The results of quantitative Nc Ab determination are shown in Fig. 8.

In the 1st stage, the majority of volunteers did not have detectable Nc Abs, meaning that when tested, levels were below a minimum (< 17 BAU/ml). Negative results were most often detected in children aged 1–17 years and young people aged 18–29 years, and to a lesser extent among persons aged 30–39 years (Fig. 8A). There were no significant differences between the average shares of seronegative individuals within these three age groups. Among volunteers in whom Nc Abs were detected, concentrations were more often moderate, ranging from 32 to 124 BAU/ml (from 15.3 to 34.6% of volunteers). The largest share of such individuals was identified in the age group of 50–59 years (34.6%; 95% CI: 30.7–38.5). The differences compared with other age groups, except for the groups 1–17 and 40–49 years old, were significant at $p < 0.05$. The share of individuals with Nc Abs in concentrations less than or greater than the range of 32–124 BAU/ml were significantly lower in all age groups.

By the 2nd stage, Nc Ab levels changed noticeably, primarily due to a decrease in the share of seronegative individuals by 4.6-fold, $p < 0.0001$ (Fig. 8B). This process was most active in the middle and older age groups from 40 to 69 years. At the same time, there was a 10-fold increase in the share of volunteers with

maximum Nc Ab content exceeding 667 BAU/ml ($p < 0.0001$). The share of individuals with very low Nc Ab content (17–31 BAU/ml) decreased by 2.9-fold ($p < 0.0001$). In contrast, the shares of individuals with average (125–332 BAU/ml), high (333–666 BAU/ml), and very high (> 666 BAU/ml) Ab levels increased by 2.0-fold, 5.4-fold and 10-fold, respectively. All differences were significant at $p \leq 0.001$. Thus, by the 2nd stage there was an increase in the share of seropositive individuals with medium and high Ab levels.

By the 3rd stage, the share of seronegative volunteers did not change significantly compared to the 2nd, but there was a two-fold increase in the share of individuals with a moderate Ab level in the range 32–124 BAU/ml (Fig. 8C) with significance at $p < 0.0001$. The share of individuals with Ab levels within 125–332 BAU/ml increased by only 1.4-fold, yet it was significant ($p < 0.001$). In this context, decreases in the share of individuals with high Ab levels were unexpected: 333–666 BAU/ml by 1.9-fold; and in the group with titers > 667 BAU/ml, by even 4.6-fold ($p < 0.001$). In other words, among seropositive volunteers, individuals with low and moderate Nc Ab levels predominated in 3rd stage. Unfortunately, we were unable to find a convincing explanation for this phenomenon. We can only assume that this is due to specifics of the organized vaccination campaign, which we discuss further in the corresponding section.

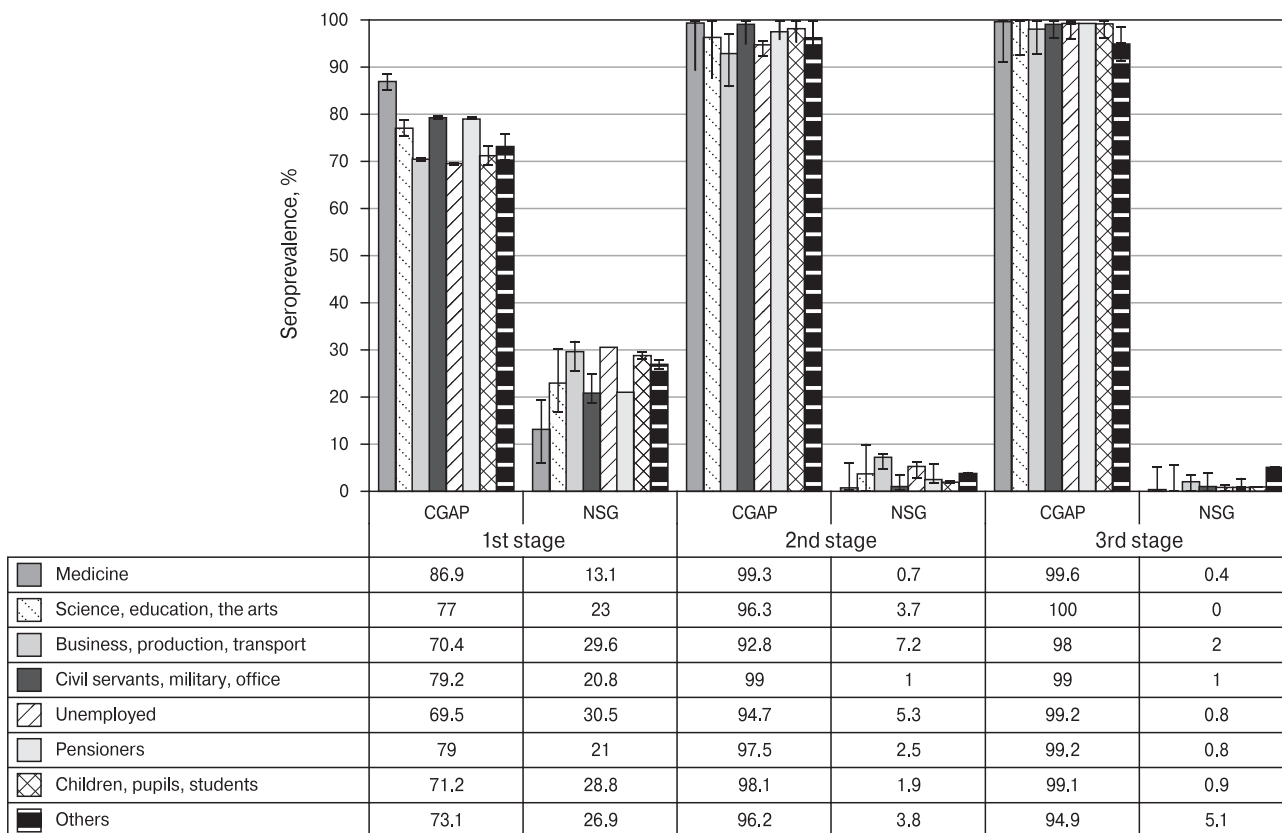


Figure 6. Shares of seronegative (NSG) and seropositive (CGAP) volunteers in different professional groups throughout seromonitoring

Note. Vertical black lines are 95% confidence intervals.

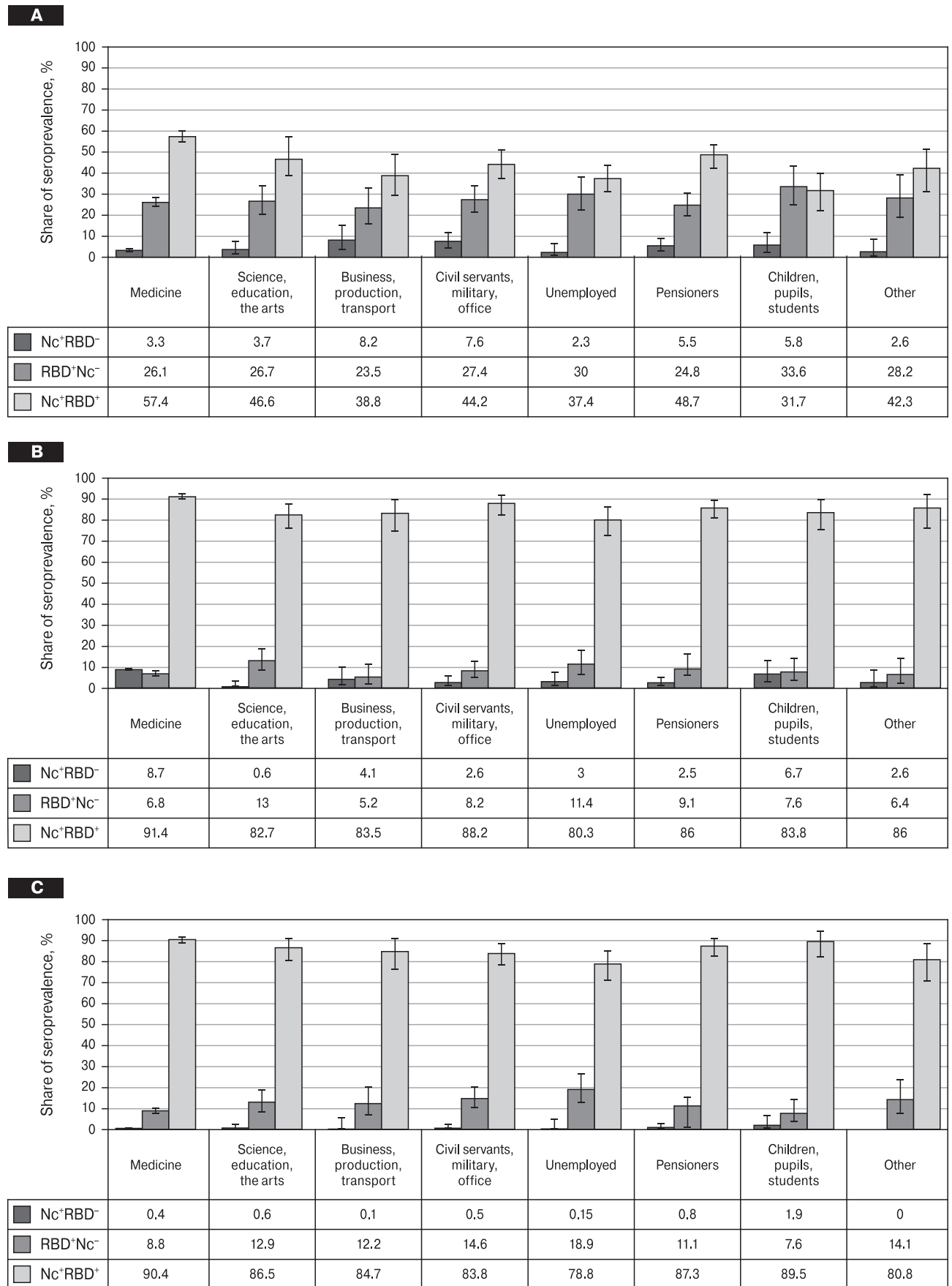


Figure 7. Humoral immunity dynamics (Nc, RBD Abs) among volunteers by professional group

Notes. Vertical black lines are 95% confidence intervals. Letters above the diagrams: A — 1st stage, B — 2nd stage, C — 3rd stage of the study.

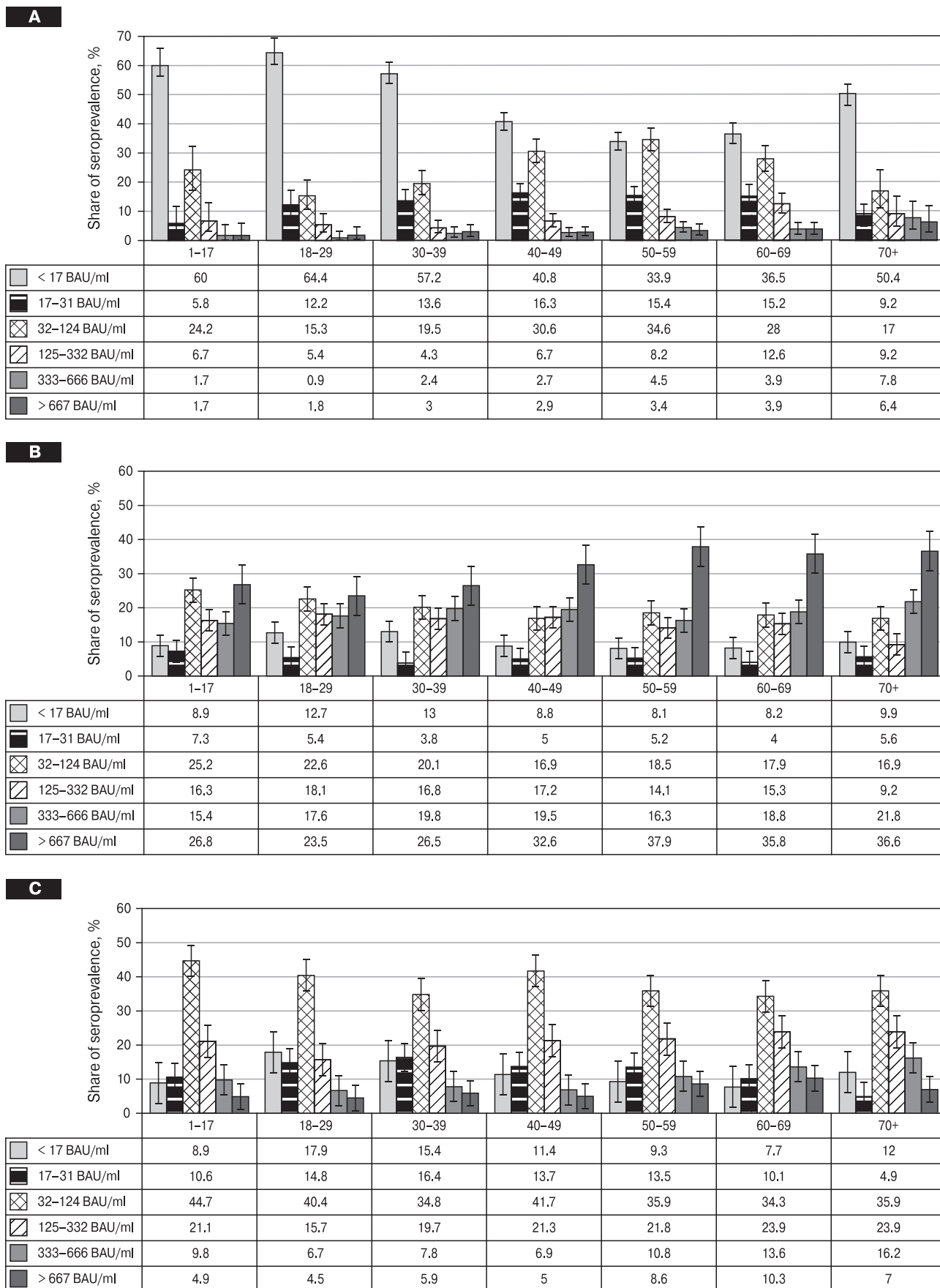


Figure 8. Distribution of Nc Ab levels in the volunteer cohort by age group

Notes. Letters above diagrams: A — 1st stage, B — 2nd stage, C — 3rd stage of analysis. Black vertical line are 95% confidence intervals.

Quantitative RBD Ab levels in volunteers of different age groups throughout seromonitoring. Along with Nc Abs, the leading component of the immune response to SARS-CoV-2 is RBD Abs, which ensure the mechanical stability of homotrimeric spines [7, 22, 39]. This aspect drives the constant attention to the assessment of RBD Abs, which largely determine the protectiveness and intensity of the immune response to COVID-19 vaccination [7, 13].

In the 1st stage of serological examination, the largest number of volunteers were either negative (< 22 BAU/ml) or had low RBD Ab levels in the range 22.6–220 BAU/ml (Fig. 9A), with a slight predominance in the group “1–17 years” of individuals with low RBD Ab levels (22.6–220 BAU/ml), while in other groups seronegative status predominated ($p > 0.0001$).

By the 2nd stage, the volunteer cohort distribution changed noticeably (Fig. 9B) primarily due to a sharp decrease in the share of seronegative volunteers in all age groups by an average of 16.7-fold for the cohort. In addition, in all groups of seropositive subjects, there was a significant increase in RBD Ab levels ($p < 0.0001$). The share of individuals with the highest Ab levels (> 450 BAU/ml) exceeded 70% in older age groups (Fig. 9B). In age groups up to 39 years, the proportions of individuals with average 221–450 BAU/ml (about 30%) and high > 450 BAU/ml (40–50%) levels were also significantly different.

In 3rd stage, the share of individuals with the maximum Ab level (> 450 BAU/ml) decreased by 9.6% ($p < 0.001$). In the remaining groups, changes in seropositivity were insignificant compared to 2nd stage (Fig. 9C).

Thus, quantitative RBD Ab dynamics throughout the analysis were characterized by several gradual trends. The 1st stage featured a predominance of RBD seronegative status which began to significantly decline (fewer and fewer seronegative individuals) in subsequent stages. Meanwhile, the proportion of seropositive individuals with both medium and high Ab levels, on the contrary, increased significantly. It can be assumed that a significant reason for this increase could be vaccination of the population against SARS-CoV-2 deployed by the Kyrgyz authorities, which will be discussed in the next section.

Vaccination of the population and volunteer cohort against SARS-CoV-2

The KR paid the utmost attention to the SARS-CoV-2 vaccination program. During the 2021–2023 period, a total of 6 889 780 vaccine doses were administered in the Republic. The result of this process was the achievement of vaccination coverage of almost 25% of the population by March 31, 2023. Preparations for immunization came from different sources, hence their distribution turned out to be very heterogeneous. The largest share fell on three

inactivated vaccines types (74%). The share of vector vaccines was 12.6%, and mRNA designs represented 13.0%. Most vaccines (85.9%) were supplied to the KR from various sources in 2021, while 13.5% of preparations were imported in 2022. Only 0.3% of vaccine materials, in the form of 20,160 doses of BNT162b2, was delivered in March 2023. This vaccine supply schedule determined the structure of vaccine-based prevention for the Kyrgyz population during the seromonitoring period (Fig. 10).

The graph omits minor shares of QuazVac and SinoVac vaccines (< 1%). Gam-COVID-Vac preparations (Sputnik V, Sputnik Light) are combined into one group. Of the entire set of preparations, the inactivated whole-virion Sinopharm BIBP vaccine was most often used, likely due to its dominant supply volume (71.8%). This assortment of vaccines had an impact on vaccine administration to participants in the surveyed cohort, in which the proportion of those vaccinated with inactivated whole-virion preparations was expectedly the largest in all age groups in all survey stages (Fig. 11).

The distribution by age of those immunized turned out to share key features throughout all study stages: maximum vaccination coverage was noted among the middle-aged (39–69 yrs); and the minimum was seen among children (1–17 yrs). It should be emphasized that in the 1st stage, volunteers were vaccinated more actively, especially among the ages 40–59 years, when vaccination coverage reached significant differences ($p < 0.0001$). Among children, only 5.8% (95% CI: 2.4–11.6) received vaccination, which is 7.4-fold less than among adults (Fig. 11A).

By 2nd stage, the share vaccinated in the groups 18–29 and 30–39 years old increased, yet it decreased in the groups 40–49 and 50–59 years old; all differences were insignificant (Fig. 11B). In general, the proportion of people who received inactivated vaccines increased slightly (by 2.1%). The bell-shaped distribution characteristic of the 1st stage became flatter by the 2nd stage. A significant increase in the share of individuals who received vector vaccines (mainly AZD1222) was recorded, the total proportion of which increased from 4.6% (95% CI: 3.8–5.5) in 1st stage to 10.0% (95% CI: 8.8–11.2), $p < 0.0001$. In immunization practice, mRNA types were also noted, the share of which was a modest 4.6% (95% CI: 3.8–5.5).

By the 3rd stage, the majority of volunteers received inactivated vaccines (24.8%; 95% CI: 23.1–26.5). The significance of vaccine type differences (comparison by stage) was: 3rd stage vs 1st stage at $p < 0.0001$; and 3rd stages vs 2nd stage at $p < 0.00001$ (Fig. 11C). Thus, the trend towards preferential use of inactivated vaccines continued throughout the study.

We assessed the effect of vaccination on the level and structure of volunteer humoral immunity (Fig. 12). Pronounced differences in the structure of humoral immunity were found only in the 1st stage of seromonitoring. In vaccinated volunteers, the individual seropositivity types were higher than in unvaccinated

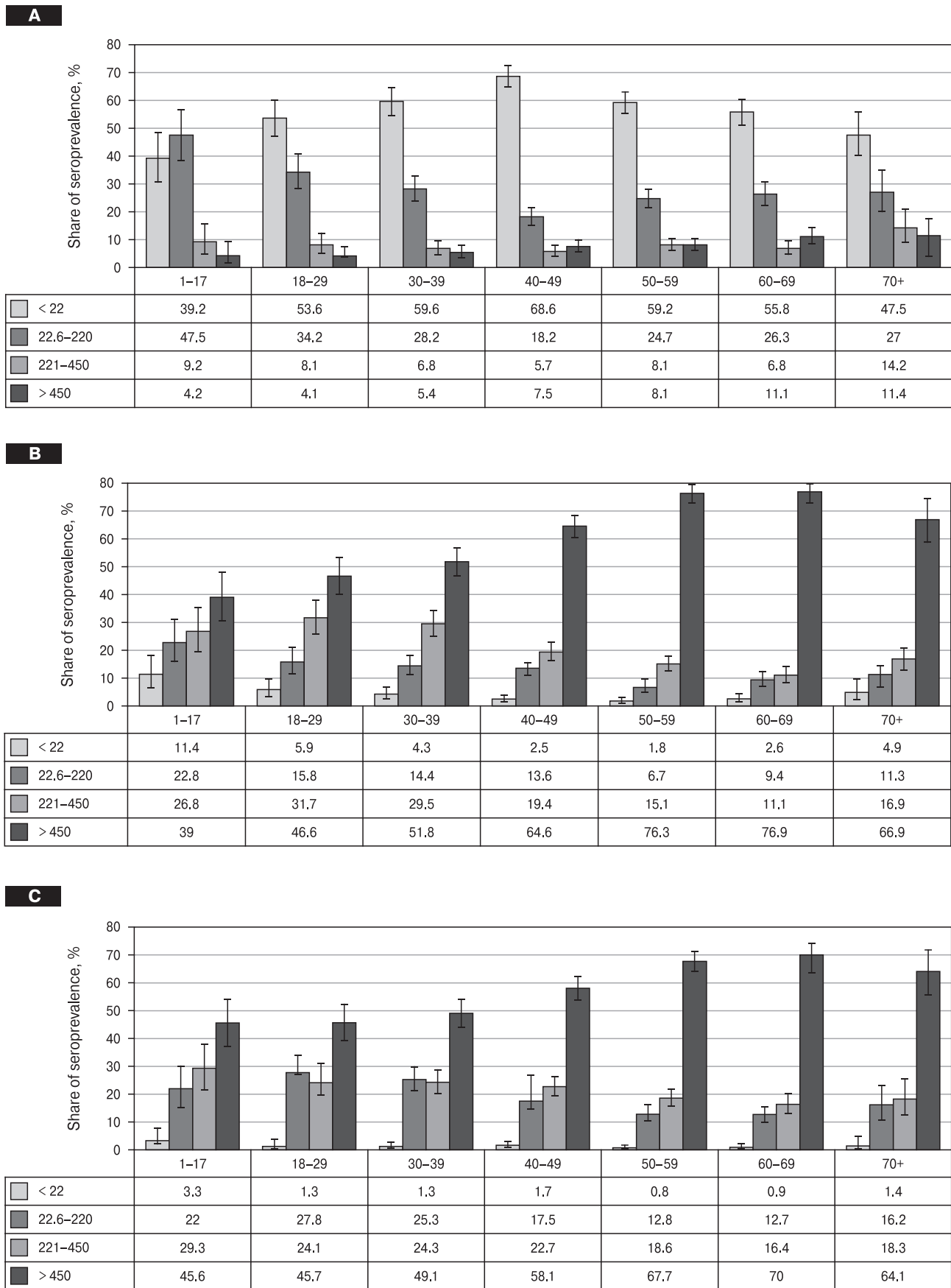


Figure 9. Distribution of RBD Ab levels in the volunteer cohort by age

Notes. Letters above the diagrams: A — 1st stage, B — 2nd stage, C — 3rd stage of the study. Black vertical lines are 95% confidence intervals. Antibody levels are in BAU/ml.

volunteers: CGAP was 91.8% (95% CI: 89.9–93.4) compared to 75.0% (95% CI: 72.8–77.3) in the unvaccinated; RBD⁺ was 89.3% (95% CI: 87.2–91.2) versus 69.4% (95% CI: 67.0–71.8); Nc⁺ was 62.9% (95% CI: 59.7–65.9) compared to 50.4% (95% CI: 47.8–53.0); and double-positive status (Nc⁺RBD⁺) was 60.4% (95% CI: 57.2–63.5) compared to 44.8% (95% CI: 42.2–47.4).

In 2nd and 3rd stages, when vaccination coverage increased and the number of volunteers who had manifest COVID-19 or an asymptomatic form increased significantly, statistically significant differences between volunteers depending on vaccination status were no longer detected.

Discussion

In terms of COVID-19 incidence, the KR is among countries with low severity of the infectious process. The total number of reported cases by mid-2023 was 206 897, which translates to a population rate of 2807 per 100 000 people. According to this indicator, the KR occupies 115th place in terms of the number of infected people globally. However, the mortality rate was 1.45% (2.8-fold higher than the global average). It is worth noting that the COVID-19 mortality rate in the KR turned out to be higher than in neighboring countries such as China (1.05%), Kazakhstan (0.98%), Tajikistan (0.70%) and Uzbekistan (0.65%), but noticeably lower than in Afghanistan (3.55%) [10].

The infectious process in the KR developed without extreme “waves”. The first patients were identified in the 12th week of 2020. Only from the 26th week (2020) was there an increase in incidence that lasted for 7 weeks, with a sharp peak occurring in the 29th week and amounting to 216.6 per 100 000 population. Subsequently, there was a sharp decrease in incidence to an almost sporadic level over the next 2–3 weeks (Fig. 1). The next peak was noted a year later, and it was already 1.4-fold lower than the initial one. Subsequently, there was a gradual decrease in the intensity of COVID-19 incidence. Starting from the 36th week (2022), incidence reached a sporadic level (Fig. 1). Such a “mild” epidemic course in Kyrgyz regions can be explained variously: on the one hand, by the beginning of vaccination; and on the other hand, by the administrative measures of the Kyrgyz government mentioned in the introduction, the totality of which made it possible to quickly localize the epidemic process.

A significant factor in assessment and analysis of the epidemic process was the KR’s participation in the international project to study COVID-19 collective immunity launched on June 21, 2021 (15 months after the outbreak of the epidemic among the Kyrgyz population). By that time, the total number of confirmed human infections was 119 873 [10]. Obviously, in addition to the symptomatic cases registered, one should take into account the difficult-to-estimate number of people who have had asymptomatic infections [15, 30]. According to our data, seroprevalence at the start of the study had reached 77.1% [26].

To determine seroprevalence levels in different Kyrgyz age groups, we assessed the number of volunteers whose blood plasma contained Nc and/or RBD Abs. This group was designated as the combined group of all positives (CGAP), and naive individuals (in whose blood Abs were not detected) were assigned to the NSG group (Fig. 2). The results obtained generally confirmed the hypothesis about the significant

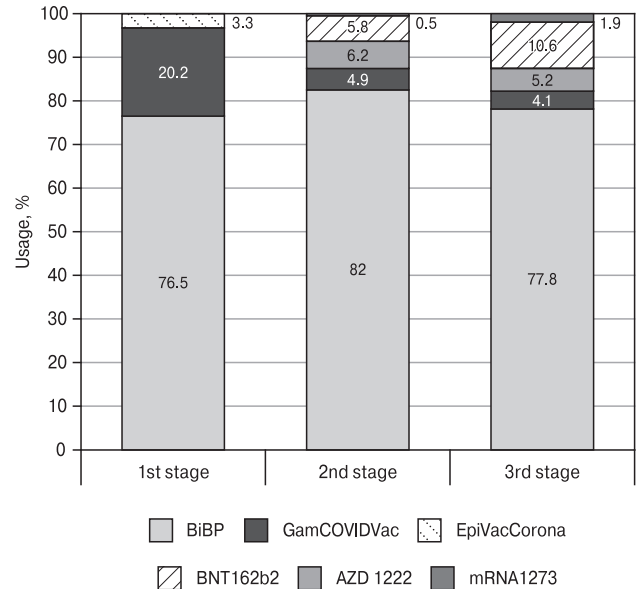


Figure 10. Usage structure of vaccines used to immunize the Kyrgyz population against coronavirus throughout seromonitoring

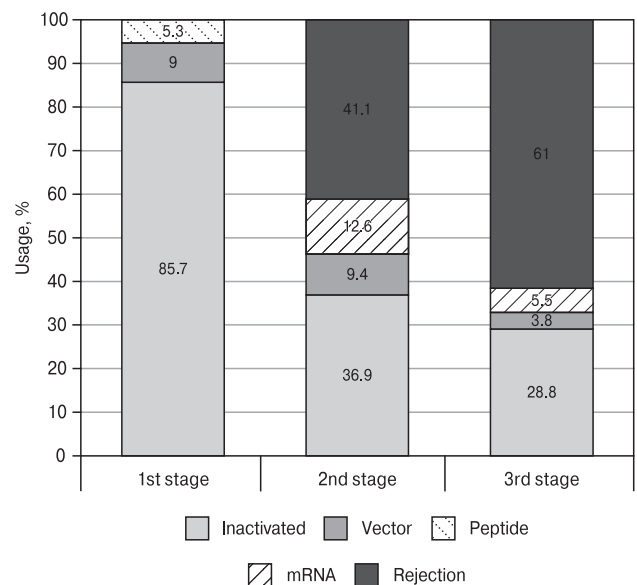
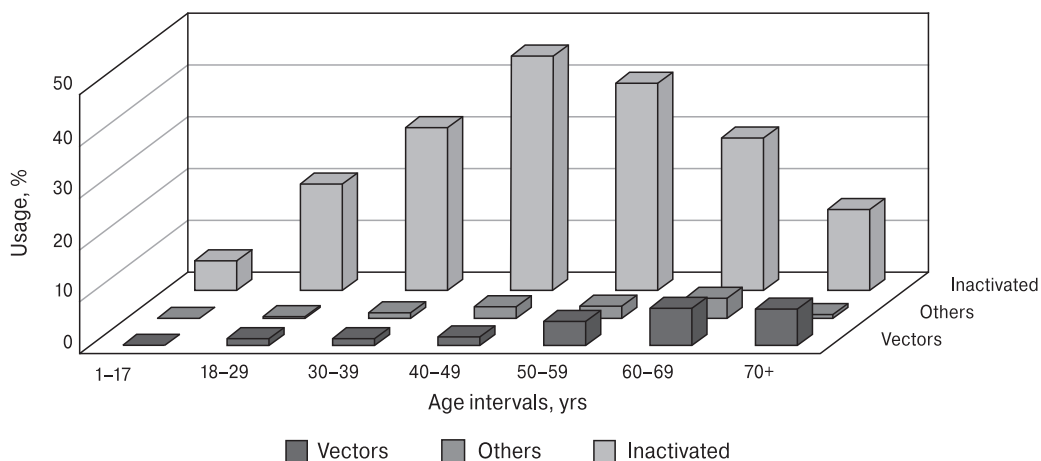


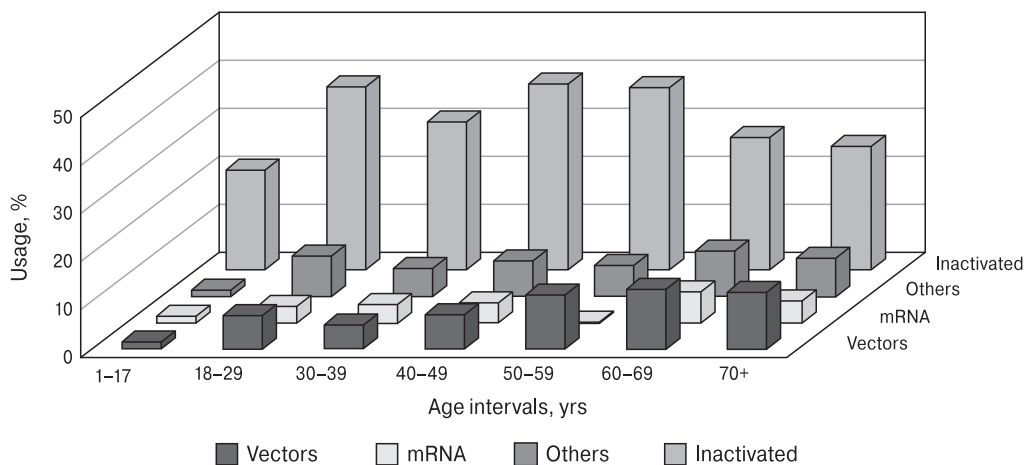
Figure 11. Structure of coronavirus vaccines administered to participants in the volunteer cohort at the stages of seromonitoring

Note. 1st stage — primary vaccination; 2nd and 3rd stages — booster revaccinations. The vaccines used were grouped into the type of technology platform: inactivated whole virion (Inactivated), vector (Vector), mRNA, peptide (Peptide). Dark grey areas — the proportion of people who refused immunization at any stage.

A



B



C

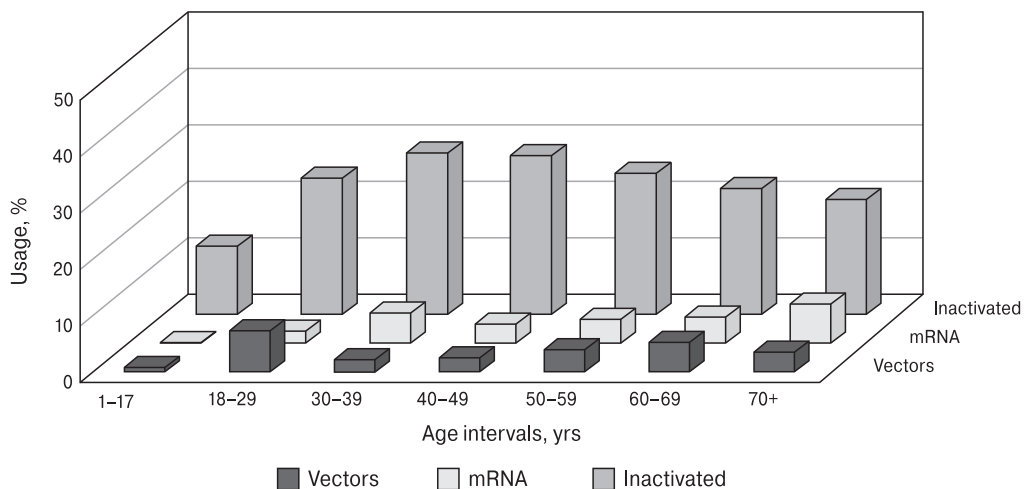


Figure 12. Age distribution of vaccine platform usage

Notes. Letters above charts: A — 1st stage; B — 2nd stage; C — 3rd stage of the study. Y-axis: vaccine platform. Bars indicate volunteers vaccinated, %. When constructing the distributions for stages II and III, those refusing vaccination, and/or those unable to specify the type of vaccine received, were not taken into account.

contribution of asymptomatic forms to total seroprevalence. The total share of CGAP volunteers by the 1st stage was 82% (95% CI: 80.4–83.5). As mentioned, the prevalence accumulated by the 1st stage amounted to 119,873 people (1.63% of the total Kyrgyz population), wherein the estimated share of asymptomatic individuals will be about 80.4%, which fully fits the lower limit of the CGAP confidence interval. The share of seronegative individuals by this time was 18% (95% CI: 16.5–19.5). Differences between groups were significant at $p < 0.00001$.

Antibody distributions in different age groups showed a significant predominance of volunteers who had Abs to both antigens or only RBD (Nc^+RBD^+ , RBD^+Nc^-) in all groups at $p < 0.0001$. The share of those seropositive for RBD was greatest among younger volunteers (1–17, 30–39 years). In older groups (40–70+ years), it was significantly lower for the groups 50–59 and 60–69 years ($p < 0.05$) (Fig. 3A). The opposite trend was observed among Nc^+RBD^+ volunteers (Fig. 3B, C). Among older volunteers, there was a significant increase in the share of double-positive volunteers compared to younger groups ($p < 0.001$). By 2nd and 3rd stages, these differences were smoothed out due to a further decrease in the share of RBD^+Nc^- and an opposite increase in the share of Nc^+RBD^+ individuals ($p < 0.00001$). Obviously, such a change in trend could be associated primarily with vaccinations carried out mainly with inactivated, and to a lesser extent vector vaccines (Fig. 11A–C). To some extent, this trend can be explained by the wider antigenic composition of inactivated vaccines compared to vector and mRNA designs [36].

When assessing the structure of seropositivity depending on regional and professional factors, the same general trends were revealed as in the age group analysis (Fig. 4, 6). In the 1st stage, the share of CGAP was lower than in subsequent stages. In the 1st stage, there was still some heterogeneity in the distribution across regions and professional groups. However, by the 2nd and 3rd stages, it had smoothed out, wherein an increase in the share CGAP was naturally accompanied by a significant decrease in NSG ($p < 0.00001$). The structure of immunity underwent similar changes. The increase in the shares of Nc^+RBD^+ volunteers was accompanied by a natural decrease in the corresponding shares of RBD^+Nc^- (Fig. 5A–C, 7A–C). In all these cases, the main reason for the increase in seroprevalence in 2nd and 3rd stages was the active vaccination of the population, including the cohort of volunteers (Fig. 1), as well as the likely involvement of the majority of the population in the infectious process via asymptomatic forms.

Indirect confirmation of the legitimacy of such a mechanism can also be provided by quantitative analysis of plasma Nc and RBD Ab content (Fig. 8A–C, 9A–C). In the 1st stage, Nc Abs (if determined) were less than 17 BAU/ml (lower sensitivity threshold of the method) in half of the volunteers ($\text{Me} = 50.4$;

$\text{Q25}:\text{Q75} = 38.6\text{--}58.6$). By the 2nd stage, Nc Ab levels in all age groups increased to 13–124 BAU/ml. In older groups (40–49 to 70+), they reached the maximum level (> 667 BAU/ml), although in general their total share did not exceed 32.6% (95% CI: 30.8–34.6).

By 3rd stage, simultaneously with the increase in CGAP, there was an increase in the share of those with moderate Nc Ab levels in the range 32–124 BAU/ml to 37.6% (95% CI: 35.7–39.5), alongside a statistically significant decrease in the share of those with high Nc Ab levels (> 667 BAU/ml) to 7.1% (95% CI: 6.1–8.2). This process seems unusual, and we were unable to find a rational explanation for it. Regarding RBD Abs, their dynamics fit well into the characteristics of collective immunity development described above. In the 1st stage, RBD negative individuals (< 22 BAU/ml) dominated. As collective immunity formed, RBD Ab titers naturally increased. This reached a maximum by 3rd stage, wherein 64.9% (95% CI: 63.0–66.8) of volunteers had high levels (> 450 BAU/ml), which is quite consistent with vaccination dynamics (Fig. 1, 2).

The obtained results of assessing volunteer plasma Nc and RBD Ab levels reflect the real state of collective immunity formed both naturally (via manifest and/or asymptomatic infection) and artificially (via vaccination) ways [21]. Regarding Nc Ab content, this largely reflects previous infection [3]. Insofar as the share of symptomatic COVID-19 cases did not exceed a sporadic level during the seromonitoring period, this situation inevitably manifested itself as low plasma Nc Ab levels in examined individuals [38].

The results of SARS-CoV-2 seroprevalence analysis clearly indicate that collective immunity is a cumulative response to the combined interaction of two main factors: the natural reaction of the immune system to the introduction of a pathogenic agent into the body on the one hand; and the response to the use of specific vaccines against SARS-CoV-2 on the other. The result of this process was the formation of immune resistance, which consists of the harmonious interaction of the cellular and humoral components of the immune response [25, 29]. Since a detailed consideration of cellular factors of the immune response was not the scope of this study, we focused only on the humoral component: circulating Abs. The most important step in the fight against the COVID-19 pandemic is vaccine-based prevention, whose origins date to the time of E. Jenner, followed by the basic principles laid down in the XIX century by L. Pasteur.

The unprecedented, rapid development of vaccines on major technology platforms since the start of the COVID-19 pandemic is a clear example of the results of cooperation among the world's technologically advanced countries. Currently, at least four main types have been created: inactivated whole-virion vaccines, vector vaccines, mRNA vaccines, and peptide vaccines [17]. In addition, development of other preparations, including live attenuated vaccines, continues [19].

As the Kyrgyz Republic does not have its own technologies or capacity to produce immunomodulatory drugs against SARS-CoV-2, vaccines obtained at different times and from different sources (purchases, humanitarian aid, etc.) were used. At various times, eight different vaccines were used from different platforms: inactivated whole-virion vaccines, vector vaccines, mRNA vaccines, and peptide vaccines (Fig. 10). In the KR, preference was given to inactivated whole-virion vaccines, the leader among which was Sinopharm-BIBP (VeroCell). Its share, both in the KR overall and in the surveyed cohort, was maximal throughout all seromonitoring stages (Fig. 10, 11).

It was interesting to evaluate the attitude of volunteers towards vaccination, as reflected by the example of 920 individuals vaccinated in the 1st stage. By the 2nd stage, 41.4% of volunteers refused re-vaccination, and by the 3rd stage their share increased to 61%. It can be assumed that the reason behind this was the belief that there was no need for this procedure against the backdrop of a decrease in COVID-19 incidence to a sporadic level (Fig. 1). To be fair, it is worth noting that the significant proportion of “refusers” did not affect the state of collective immunity in the cohort. CGAP status exceeded 99% by 3rd stage, with 88% being doubly seropositive (Nc⁺RBD⁺).

In this regard, it is logical to assume that vaccination of the population was carried out in the context of significant incidence, with a tendency not so much towards manifest COVID-19, but rather asymptomatic infection [30]. In such cases, even the primary single immunization of a person who already has some natural immunity after infection inevitably causes the most durable and long-lasting hybrid immunity [11, 31]. This thesis can be confirmed by the absence of a noticeable influence of “refusers” on the level of CGAP in the population (Fig. 2).

In this context, it can be suggested that stable adaptive immunity in the examined cohort could be due to vaccine usage structure. Among them, the leader remained the inactivated whole-virion preparation Sinopharm BIBP (in all stages). It, like any vaccine from such a platform, contained the maximum set of antigens necessary for formation of polyvalent adaptive immunity [34, 36, 40].

Conclusion

The SARS-CoV-2 collective immunity that formed in the Kyrgyz Republic effectively blocked COVID-19 incidence. The main factor in adaptive humoral immunity was the high proportion of doubly seropositive (Nc⁺RBD⁺) individuals. The widespread use of inactivated whole-virion vaccines was accompanied by a significant increase in the seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies and a decrease in COVID-19 incidence to a sporadic level.

Additional information

Conflict of interest. The authors declare the absence of any conflict of interest.

Author contributions. AYP, OTK, — general planning; VYS coordination of work at the inter-governmental level; SAE — research organization; ZSN, ZNN, GZS, BID, UUA — collection and primary processing of information; AMM, IVD, EVZ, VGD, OBZ, APR — sample preparation and immunological analysis of blood samples; VAI — software; ESR- translation and text editing; VSS — statistical analysis, writing and final verification of the article text; AAT — general research guidance. All authors have read and approved the final manuscript.

References

1. Aboura S. The influence of climate factors and government interventions on the Covid-19 pandemic: evidence from 134 countries. *Environ. Res.*, 2022, vol. 208: 112484. doi: 10.1016/j.envres.2021.112484
2. About Kyrgyz Republic. URL: <https://invest.gov.kg/ru/general-information/> (17.04.2023)
3. ACTIV-3/TICO Study Group; Rogers A.J., Wentworth D., Phillips A., Shaw-Saliba K., Dewar R.L., Aggarwal N.R., Babiker A.G., Chang W., Dharan N.J., Davey V.J., Higgs E.S., Gerry N., Ginde A.A., Hayanga J.W.A., Highbarger H., Highbarger J.L., Jain M.K., Kan V., Kim K., Lallemand P., Leshnowar B.G., Lutaakome J.K., Matthews G., Mourad A., Mylonakis E., Natarajan V., Padilla M.L., Pandit L.M., Paredes R., Pett S., Ramachandruni S., Rehman M.T., Sherman B.T., Files D.C., Brown S.M., Matthay M.A., Thompson B.T., Neaton J.D., Lane H.C., Lundgren J.D. The association of baseline plasma SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen level and outcomes in patients hospitalized with COVID-19. *Ann. Intern. Med.*, 2022, vol. 175, no. 10, pp. 1401–1410. doi: 10.7326/M22-0924
4. Agresti A., Coull B.A. Approximate is better than “exact” for interval estimation of binomial proportions. *Am. Stat.*, 1998, vol. 52, pp. 119–126.
5. Ali H., Alahmad B., Al-Shammari A.A., Alterki A., Hammad M., Cherian P., Alkhairi I., Sindhu S., Thanaraj T.A., Mohammad A., Alghanim G., Deverajan S., Ahmad R., El-Shazly S., Dashti A.A., Shehab M., Al-Sabah S., Alkandari A., Abubaker J., Abu-Farha M., Al-Mulla F. Previous COVID-19 infection and antibody levels after vaccination. *Front. Public Health*, 2021, vol. 9: 778243. doi: 10.3389/fpubh.2021.778243
6. Bhattacharya M., Sharma A.R., Dhama K., Agoramorthy G., Chakraborty C. Hybrid immunity against COVID-19 in different countries with a special emphasis on the Indian scenario during the Omicron period. *Int. Immunopharmacol.*, 2022, vol. 108: 108766. doi: 10.1016/j.intimp.2022.108766
7. Carrillo J., Izquierdo-Useros N., Ávila-Nieto C., Pradenas E., Clotet B., Blanco J. Humoral immune responses and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2; implications in pathogenesis and protective immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2021, vol. 538, pp. 187–191. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.10.108

8. Chuveleva N.N. Kyrgyzstan. Economic and geographical position. Natural conditions and resources. Educational portal "Reference book". URL: https://spravochnick.ru/geografiya/kirgiziya_ekonomiko-geograficheskoe_polozhenie_prirodnnye_usloviya_i_resursy (17.04.2023)
9. Coronavirus COVID-19. URL: <https://news.mail.ru/story/incident/coronavirus/stat/world> (17.04.2023)
10. Coronavirus in Kyrgyzstan. URL: <https://coronavirus-control.ru/coronavirus-kyrgyzstan> (17.04.2023)
11. Crotty S. Hybrid immunity: COVID-19 vaccine responses provide insights into how the immune system perceives threats. *Science*, 2021, vol. 372, no. 6549, pp. 1392–1393. doi: 10.1126/science.abc2258
12. Dzushupov K., Don Lucero-Prisno E., Vishnyakov D., Lin X., Ahmadi A. COVID-19 in Kyrgyzstan: navigating a way out. *Review J. Glob. Health.*, 2021, vol. 11: 03020. doi: 10.7189/jogh.11.03020
13. Fernandes E.R., Taminato M., Apostolico J.S., Gabrielonni M.C., Lunardelli V.A., Maricato J.T., Andersen M.L., Tufik S., Rosa D.S. Robust specific RBD responses and neutralizing antibodies after ChAdOx1 nCoV-19 and CoronaVac vaccination in SARS-CoV-2-seropositive individuals. *J. Allergy Clin. Immunol. Glob.*, 2023, vol. 2, no. 2: 100083. doi: 10.1016/j.jacig.2023.100083
14. Haque A., Pant A.B. Mitigating Covid-19 in the face of emerging virus variants, breakthrough infections and vaccine hesitancy. *J. Autoimmun.*, 2022, vol. 127: 102792. doi: 10.1016/j.jaut.2021.102792
15. Johansson M.A., Quandelacy T.M., Kada S., Prasad P.V., Steele M., Brooks J.T., Slayton R.B., Biggerstaff M., Butler J.C. SARS-CoV-2 transmission from people without COVID-19 symptoms. *JAMA Netw. Open.*, 2021, vol. 4, no. 1: e2035057. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.35057
16. Jung J., Kim S.K., Lee Y., Park S., Lim Y.J., Kim E.O., Kim S.H. Rates of COVID-19 infection among healthcare workers in designated COVID-19 wards and general wards. *J. Korean Med. Sci.*, 2022, vol. 37, no. 43: e308. doi: 10.3346/jkms.2022.37.e308
17. Khandker S.S., Godman B., Jawad M.I., Meghla B.A., Tisha T.A., Khondoker M.U., Haq M.A., Charan J., Talukder A.A., Azmuda N., Sharmin S., Jamiruddin M.R., Haque M., Adnan N. A systematic review on COVID-19 vaccine strategies, their effectiveness, and issues. *Vaccines (Basel)*, 2021, vol. 9, no. 12: 1387. doi: 10.3390/vaccines9121387
18. Kyrgyzstan Population 2023. URL: <https://worldpopulationreview.com/countries/kyrgyzstan-population> (17.04.2023)
19. Li M., Wang H., Tian L., Pang Z., Yang Q., Huang T., Fan J., Song L., Tong Y., Fan H. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2022, vol. 7, no. 1: 146. doi: 10.1038/s41392-022-00996-y
20. Matz M., Allemanni C., van Tongeren M., Nafilyan V., Rhodes S., van Veldhoven K., Pembrey L., Coleman M.P., Pearce N. Excess mortality among essential workers in England and Wales during the COVID-19 pandemic. *J. Epidemiol. Community Health.*, 2022, vol. 76, no. 7, pp. 660–666. doi: 10.1136/jech-2022-218786
21. Mittal A., Khattri A., Verma V. Structural and antigenic variations in the spike protein of emerging SARS-CoV-2 variants. *PLoS Pathol.*, 2022, vol. 18, no. 2: e1010260. doi: 10.1371/journal.ppat.1010260
22. Moreira R.A., Guzman H.V., Boopathi S., Baker J.L., Poma A.B. Characterization of structural and energetic differences between conformations of the SARS-CoV-2 spike protein. *Materials (Basel)*, 2020, vol. 13, no. 23: 5362. doi: 10.3390/ma13235362
23. National Statistical Committee of the Kyrgyz Republic. Population. URL: <https://www.stat.kg/ru/statistics/naselenie> (17.04.2023)
24. Nordström P., Ballin M., Nordström A. Risk of SARS-CoV-2 reinfection and COVID-19 hospitalisation in individuals with natural and hybrid immunity: a retrospective, total population cohort study in Sweden. *Lancet Infect. Dis.*, 2022, vol. 22, no. 6, pp. 781–790. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00143-8
25. Paces J., Strizova Z., Smrz D., Cerny J. COVID-19 and the immune system. *Physiol. Res.*, 2020, vol. 69, no. 3, pp. 379–388. doi: 10.33549/physiolres.934492
26. Popova A.Yu., Kasymov O.T., Smolenski V.Y., Smirnov V.S., Egorova S.A., Nurmatov Z.S., Milichkina A.M., Suranbaeva G.S., Kuchuk T.E., Khamitova I.V., Zueva E.V., Ivanov V.A., Nuridinova Z.N., Derkenbaeva A.A., Drobyshevskaya V.G., Sattarova G.Z., Kaliev M.T., Gubanova A.V., Zhimbaeva O.B., Razumovskaya A.P., Verbov V.N., Likhachev I.V., Krasnov A.V., Totolian A.A. SARS-CoV-2 herd immunity of the Kyrgyz population in 2021. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2022, vol. 211, no. 4, pp. 195–210. doi: 10.1007/s00430-022-00744-7
27. Popova A.Yu., Totolian A.A. Methodology for assessing herd immunity to the SARS-CoV-2 virus in the context of the COVID-19 pandemic. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 609–616. doi: 10.15789/2220-7619-MFA-1770
28. Population of Kyrgyzstan. URL: <https://countrymeters.info/ru/Kyrgyzstan> (17.04.2023)
29. Primorac D., Vrdoljak K., Brlek P., Pavelić E., Molnar V., Matišić V., Erceg Ivkošić I., Parčina M. Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2. *Front. Immunol.*, 2022, vol. 13: 848582. doi: 10.3389/fimmu.2022.848582
30. Ravindra K., Malik V.S., Padhi B.K., Goel S., Gupta M. Asymptomatic infection and transmission of COVID-19 among clusters: systematic review and meta-analysis. *Public Health.*, 2022, vol. 203, pp. 100–109. doi: 10.1016/j.puhe.2021.12.003
31. Sette A., Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 2021, vol. 184, no. 4, pp. 861–880. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.007
32. Significant Difference Calculator (z-test). RADAR Research Company. 2020. URL: <https://radar-research.ru/software/z-test-calculator> (07.10.2021)
33. Stokel-Walker C. What we know about COVID-19 reinfection so far. *BMJ*, 2021, vol. 372: 99. doi: 10.1136/bmj.n99
34. Totolian A.A., Smirnov V.S., Krasnov A.A., Ramsay E.S., Dedkov V.G., Popova A.Y. COVID-19 case numbers as a function of regional testing strategy, vaccination coverage, and vaccine type. *Viruses*, 2023, vol. 15: 2181. doi:10.3390/v15112181
35. Wald A., Wolfowitz J. Confidence limits for continuous distribution functions. *Ann. Math. Stat.*, 1939, vol. 10, no. 2, pp. 105–118.
36. Wang H., Zhang Y., Huang B., Deng W., Quan Y., Wang W., Xu W., Zhao Y., Li N., Zhang J., Liang H., Bao L., Xu Y., Ding L., Zhou W., Gao H., Liu J., Niu P., Zhao L., Zhen W., Fu H., Yu S., Zhang Z., Xu G., Li C., Lou Z., Xu M., Qin C., Wu G., Gao G.F., Tan W., Yang X. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2. *Cell*, 2020, vol. 182, no. 3, pp.713–721.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.008
37. Wang J., Kaperak C., Sato T., Sakuraba A. COVID-19 reinfection: a rapid systematic review of case reports and case series. *J. Investig. Med.*, 2021, vol. 69, pp. 1253–1255. doi: 10.1136/jim-2021-001853
38. Wheeler S.E., Shurin G.V., Yost M., Anderson A., Pinto L., Wells A., Shurin M.R. Differential antibody response to mRNA COVID-19 vaccines in healthy subjects. *Microbiol. Spectr.*, 2021, vol. 9, no. 1: e0034121. doi: 10.1128/Spectrum.00341-21

39. Yadav R., Chaudhary J.K., Jain N., Chaudhary P.K., Khanra S., Dhamija P., Sharma A., Kumar A., Handu S. Role of structural and non-structural proteins and therapeutic targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 4: 821. doi: 10.3390/cells10040821
40. Zhang Y., Zeng G., Pan H., Li C., Hu Y., Chu K., Han W., Chen Z., Tang R., Yin W., Chen X., Hu Y., Liu X., Jiang C., Li J., Yang M., Song Y., Wang X., Gao Q., Zhu F. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect. Dis.*, 2021, vol. 21, no. 2, pp. 181–192. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30843-4
41. Zheng J., Deng Y., Zhao Z., Mao B., Lu M., Lin Y., Huang A. Characterization of SARS-CoV-2-specific humoral immunity and its potential applications and therapeutic prospects. *Cell. Mol. Immunol.* 2022, vol. 19, no. 2, pp. 150–157. doi: 10.1038/s41423-021-00774-w

Авторы:

Попова А.Ю., д.м.н., профессор, руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия;

Смирнов В.С., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Касымов О.Т., д.м.н., профессор, директор НПО «Профилактическая медицина» Министерства здравоохранения и социального развития, Бишкек, Кыргызская Республика;

Егорова С.А., д.м.н., зам. директора по инновациям ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Нурматов З.Ш., руководитель Республиканского научно-практического центра по контролю вирусных инфекций, НПО «Профилактическая медицина» Министерства здравоохранения и социального развития, Бишкек, Кыргызская Республика;

Дрозд И.В., к.б.н., зав. центральной клинико-диагностической лабораторией ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Миличкина А.М., к.м.н., главный врач медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Смоленский В.Ю., зам. руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия;

Нуридинова Ж.Н., научный сотрудник НПО «Профилактическая медицина» Министерства здравоохранения и социального развития, Бишкек, Кыргызская Республика;

Иванов В.А., IT-аналитик ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Саттарова Г.Ж., научный сотрудник НПО «Профилактическая медицина» Министерства здравоохранения и социального развития, Бишкек, Кыргызская Республика;

Рэмзи Э.С., научный аналитик ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Джангазиев Б.И., зам. министра здравоохранения по цифровому развитию, Министерство здравоохранения Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика;

Зуева Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Арабий У.У., специалист по мониторингу и оценке Республиканского центра иммунопрофилактики Министерства здравоохранения Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика;

Дробышевская В.Г., врач клинической лабораторной диагностики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Жимбаева О.Б., врач Центральной клинико-диагностической лаборатории Медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Разумовская А.П., врач клинической лабораторной диагностики Центральной клинико-диагностической лаборатории Медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Тотолан А.А., д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Popova A.Yu., DSc (Medicine), Professor, Head of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation;

Smirnov V.S., DSc (Medicine), Professor, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Kasymov O.T., DSc (Medicine), Professor, Director of the NGO “Preventive Medicine”, Bishkek, Kyrgyz Republic;

Egorova S.A., DSc (Medicine), Deputy Director for Innovation, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Nurmatov Z.S., DSc (Medicine), Head of the Republican Scientific and Practical Center for the Control of Viral Infections, NGO “Preventive Medicine”, Bishkek, Kyrgyz Republic;

Drozd I.V., PhD (Biology), Head of the Central Clinical Diagnostic Laboratory, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Milichkina A.M., PhD (Medicine), Head Physician of the Medical Center of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Smolenskii V.Yu., Deputy Head of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation;

Nuridinova Z.N., Researcher, NGO “Preventive Medicine”, Bishkek, Kyrgyz Republic;

Ivanov V.A., IT analyst, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Sattarova G.Z., Researcher, NGO “Preventive Medicine”, Bishkek, Kyrgyz Republic;

Ramsay E.S., Science Analyst, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Dzhangaziev B.I., Deputy Minister of Health for Digital Development, Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Bishkek, Kyrgyz Republic;

Zueva E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Arabay U.U., Monitoring and Evaluation Specialist, Republican Immunoprophylaxis Center of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Bishkek, Kyrgyz Republic;

Drobyshevskaya V.G., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Medical Center of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Zhimbaeva O.B., Physician, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Razumovskaya A.P., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Totolian A.A., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

FEATURES OF *ESCHERICHIA COLI* SAMPLES FROM PATIENTS WITH DIARRHEAL SYNDROME IN THE REPUBLIC OF GUINEA

M.A. Makarova^{a,b}, R. Balde^c, M. Boiro^c, Z.N. Matveeva^a, L.A. Kaftyreva^{a,b}

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

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

^c Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea

Abstract. *Introduction.* Diarrheal diseases are a global public health issue and cause 15% of deaths in children under 5 years old, of which about 80% occur in the regions of Africa and Southeast Asia. According to the Global Enteric Multicentre Study (GEMS) conducted in a number of African countries, one of the leading pathogens of high risk of death in infants and young children is diarrheagenic *E. coli* (DEC). In recent decades, antimicrobial resistance (AMR) has become globally ubiquitous. The Republic of Guinea urgently needs large-scale studies devoted to assessing DEC distribution and antibiotic resistance. The purpose of the study is to assess the pattern of *E. coli* infections and to test the susceptibility to antibiotics in strains of diarrheagenic *E. coli* sampled from individuals residing in the Republic of Guinea. *Materials and methods.* From 2019 to 2022, we studied 724 samples of faeces of patients with acute diarrhea, among them 72 (9.9%) children aged 1–5 years, 128 (17.7%) children aged 6–17 years, and 524 (72.4%) people aged 18 years and older; a method of polymerase chain reaction (PCR) was applied with the use of the AmpliSense[®] Escherichioses-FL reagent kit to identify the genetic determinants of DEC: EPEC, EHEC, ETEC, EIEC, and EAgrEC (Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Russia). Susceptibility to 15 antimicrobial agents was found by the disc-diffusion method using Mueller–Hinton agar (Russia) and Oxoid discs (UK). Results were interpreted according EUCAST criteria, versions 2019–2022 (https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents). *Results.* For the period from 2019 to 2022, the percentage of *E. coli* infections in the etiological pattern of acute intestinal infections amounted to 51.7%. In the age-related manner, DEC was significantly more common in young children aged 0–5 (96.9%, $p < 0.05$) as compared to school age children aged 6–17 (53.9%) and adults (45.6%). In all years of observation, EAgrEC strains prevailed, accounting for 38.4%. Other DEC pathotypes, EPEC, ETEC, EIEC and STEC, accounted for 27.2%, 17.5%, 11.8%, and 5.1%, respectively. DEC strains are susceptible to meropenem, amikacin, and nitrofurantoin. The activity of other antibiotics ranged from 11.3% for ampicillin, 28.3% for trimethoprim-sulfamethoxazole, and 34.0% for tetracycline to 73.6% for cephalosporins, 84.0% for aminoglycosides, and 98.1% for fluorinated quinolones. *Conclusion.* To reduce the burden of diarrheal diseases in the Republic of Guinea, it may be necessary to conduct targeted epidemiological and microbiological studies to identify DEC and monitor the development of antimicrobial resistance of *E. coli* infection pathogens in the population.

Key words: diarrhea, diarrheagenic *E. coli*, pathogenicity, genetic determinants, susceptibility to antibiotics.

Адрес для переписки:

Макарова Мария Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 921 631-31-83.
E-mail: makmaria@mail.ru

Contacts:

Maria A. Makarova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 921 631-31-83.
E-mail: makmaria@mail.ru

Для цитирования:

Макарова М.А., Балдэ Р., Буаро М., Матвеева З.Н., Кафтырева Л.А.
Характеристика *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с диарейным синдромом в Гвинейской Республике // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1109–1116. doi: 10.15789/2220-7619-FOI-15633

Citation:

Makarova M.A., Balde R., Boiro M., Matveeva Z.N., Kaftyreva L.A. Features of *Escherichia coli* samples from patients with diarrheal syndrome in the Republic of Guinea // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1109–1116. doi: 10.15789/2220-7619-FOI-15633

© Makarova M.A. et al., 2023

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-FOI-15633>

ХАРАКТЕРИСТИКА *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ДИАРЕЙНЫМ СИНДРОМОМ В ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

Макарова М.А.^{1,2}, Балдэ Р.³, Буаро М.³, Матвеева З.Н.¹, Кафтырева Л.А.^{1,2}

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

² ФБГБОУ ВО Северо-Западный государственный университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт прикладной биологии, г. Киндия, Гвинейская Республика

Резюме. *Введение.* Диарейные заболевания — глобальная проблема общественного здравоохранения и причина 15% летальных исходов у детей в возрасте до пяти лет, из которых около 80% приходится на регионы стран Африки и Юго-Восточной Азии. По результатам Глобального многоцентрового исследования (GEMES), проведенного в ряде стран Африки, установлено, что одним из ведущих патогенов высокого риска смерти пациентов в возрасте до пяти лет являются диареегенные *E. coli* (DEC). В последние десятилетия резистентность микроорганизмов к антибиотикам приобрела глобальный характер. В Гвинейской Республике существует острая необходимость в проведении широкомасштабных исследований по изучению распространения DEC и их резистентности к антибиотикам. Цель исследования: оценить структуру эшерихиозов и изучить чувствительность к антибиотикам штаммов диареегенных *E. coli*, выделенных от жителей Гвинейской Республики. *Материалы и методы.* Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с набором реагентов «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» для выявления генетических детерминант DEC: EPEC, EHEC, ETEC, EIEC, EAgEC (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в период 2019–2022 гг. исследовали 724 пробы испражнений пациентов с ОКИ, из них детей в возрасте 1–5 лет — 72 (9,9%); 6–17 лет — 128 (17,7%); 18 лет и старше — 524 (72,4%). Чувствительность к 15 антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтона (Россия) с дисками Oxoid (Великобритания), согласно рекомендациям EUCAST (2019–2022 гг.). *Результаты.* За период 2019–2022 гг. в этиологической структуре ОКИ доля эшерихиозов составляла 51,7%. В возрастной структуре значимо чаще DEC встречались у детей раннего возраста 0–5 лет (96,9%, $p < 0,05$) по сравнению с группой детей школьного возраста 6–17 лет (53,9%) и взрослыми (45,6%). Во все годы наблюдения преобладали штаммы патогруппы EAgEC, на долю которых приходилось 38,4%. На долю других патогрупп — EPEC, ETEC, EIEC и STEC — приходилось 27,2, 17,5, 11,8 и 5,1% соответственно. Штаммы DEC сохраняли чувствительность к меропенему, амикацину и нитрофурантоину. Активность других антибиотиков варьировалась от 11,3% к ампициллину, 28,3% — триметоприм-сульфаметоксазолу, 34% — тетрациклину, до 73,6% — цефалоспорином, 84,0% — аминогликозидам и 98,1% — фторхинолонам. *Заключение.* Для снижения бремени диарейных заболеваний на территории Гвинейской Республики необходимо проведение целенаправленных эпидемиологических и микробиологических исследований по выявлению DEC и мониторинга развития резистентности в популяции возбудителей эшерихиозов.

Ключевые слова: диарея, диареегенные *E. coli*, патогенность, генетические детерминанты, чувствительность к антибиотикам.

Overview

Diarrheal diseases are a global public health issue and cause of high morbidity and mortality in many countries, as well as one of the frequent reasons why patients of all ages seek medical care [5, 6]. Every year, about 1.6 million people die from diarrhea globally, mainly in developing countries and economically poor regions [1, 11]. Diarrheal diseases cause 15% of deaths in infants and young children, of which about 80% occur in the regions of Africa and Southeast Asia [16, 21, 23, 29]. Even though global mortality from diarrhea has decreased significantly over the past 25 years, the incidence of acute diarrhea in Africa remains high [10, 13]. Experts estimate that, by 2030, 4.4 million children younger than 5 years will die every year from infectious diseases, and 60% of cases will be recorded in Africa [19, 22].

According to the Population Division under the UN Department of Economic and Social Affairs, the population of the Republic of Guinea in 2023 will increase by 379 285, whereas at the end of the year

it will be 14 411 299, of which 12.4% (1 788 459) will be children younger than 6 years. [<https://countrymeters.info/ru/Guinea>, <https://bdex.ru/naselenie/guinea>]. Based on results of the Global Enteric Multicentre Study (GEMS) conducted in four African countries (Kenya, Mali, Mozambique, and Gambia), it was found that *E. coli* and *Cryptosporidium* are among the pathogens causing a high risk of death in infants and young children with moderate and severe diarrheal diseases [1].

Currently, diarrheagenic *E. coli* (DEC) causing acute diarrhea are classified into the following pathogenetic groups (pathotypes): enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), shigatoxin-producing *E. coli* (STEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), and enteroaggregative *E. coli* (EAgEC). Diffuse-adherent *E. coli* (DAEC) have also been described; however, evidence that is more experimental is required to classify them into a separate group [8]. The DEC pathotypes differ in key mechanisms of pathogenesis and the presence of specific virulence factors.

In recent decades, the issue of antimicrobial resistance to antibiotics has become global in nature and is considered as one of the threats to national security in many countries [3, 7]. In 2014, WHO included *E. coli* in the list of seven species of bacteria that cause life-threatening diseases, such as sepsis, diarrhea, pneumonia, UTI, etc., as indicators for monitoring the development of resistance antibiotics [25, 28]. Unified standardised methods for determining susceptibility to antibiotics and interpretation criteria based on modern knowledge of resistance mechanisms will improve the quality of research and conduct effective monitoring not only at the local and regional level but at the international level as well [18].

Presently there is an urgent need for large-scale studies in the Republic of Guinea to discover the incidence of diarrhegenic *E. coli* and their susceptibility to antibiotics

The purpose of this study is to assess the structure of *E. coli* infections and to test the susceptibility to antibiotics in strains of diarrhegenic *E. coli* sampled from individuals residing in the Republic of Guinea.

Materials and methods

The studies were carried out in the laboratory of the Guinea-Russian Research Centre of Epidemiology and Prevention of Infectious Diseases run by Rospotrebnadzor (Kindia, Republic of Guinea) and the Laboratory of Intestinal Infections at the Saint Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology (Saint Petersburg, Russia). From 2019 to 2022, were studied 724 samples of faeces of patients with acute diarrhea, among them 72 (9.9%) children aged 1–5 years, 128 (17.7%) children aged 6–17 years, and 524 (72.4%) people aged 18 years and older; a method of polymerase chain reaction (PCR), was applied with the use of the AmpliSense® Escherichioses-FL reagent kit to identify the genetic determinants of DEC: EPEC, EHEC, ETEC, EIEC, and EA_gEC (Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Russia).

Samples with fluorescence threshold signals corresponding to the genetic determinants of EPEC, EHEC, ETEC, EIEC, EA_gEC were examined by the culture method. Endo agar was used to isolate DEC strains.

For 15 antibiotics (β -lactam penicillins: ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid; cephalosporins: cefotaxime, ceftazidime, cefepime; carbapenems: meropenem; aminoglycosides: gentamicin, tobramycin, amikacin; tetracycline, chloramphenicol; quinolones and fluoroquinolones: nalidixic acid and ciprofloxacin, nitrofurantoin, and trimethoprim-sulfamethoxazole), susceptibility of pathogens to them was found by the disc-diffusion method using Mueller–Hinton agar (Russia) and Oxoid discs (UK). Results were interpreted according EUCAST crite-

ria, versions 2019–2022 (https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents).

Multidrug resistance (MDR) phenotype, in accordance with international criteria, included strains resistant to three classes of antibiotics, specifically producers of extended spectrum beta lactamase (ESBL) and carbapenemases; extensively drug resistance phenotype (XDR) characterised strains resistant to all antibiotics except for one or two classes [2, 15].

Statistical processing of results. The obtained data were processed using the computer program Excel (Microsoft Office). Fisher's exact test was used to assess the statistical significance of differences in indicators (frequency, proportion). Differences were considered statistically significant at a 95% confidence interval ($p < 0.05$). The obtained data are presented in the form of tables and diagrams.

Results

Genetic markers of DEC were detected in faecal samples of patients of all age groups in all years of study (Table 1). For the period from 2019 to 2022, the total percentage of *E. coli* infections in the etiological structure of acute intestinal infections amounted to 51.7% (a range from 32.5% to 58.3%). In the age structure, DEC was significantly more common in young children aged 0–5 (96.9%, $p < 0.05$) compared to the group of school age children aged 6–17 (53.9%) and adults (45.6%).

In young children, DEC genetic determinants were identified in 100% of cases in 2019 and 2020, compared to 2021 (90.2%) and 2022 (91.7%). In children, aged 6–17, the findings, were ranked as follows: 45.0% in 2019, 57.1% in 2020, 60.7% in 2021, and 47.4% in 2022. Thus, almost every second child of school age had DEC as the cause of diarrhea.

In the age group over 18, DEC findings doubled compared to 2019 (23.6%): 54.9% in 2020, 45.6% in 2021, and 58.1% in 2022.

Fig. 1 shows the structure of *E. coli* infections. Both according to the cumulative data and separately by year, the EA_gEC strains prevailed, accounting for 38.4% (a range from 33.3% to 43.6%). In the average annual structure, the share of EPEC was 27.2% (a range from 19.7% to 31.0%). ETEC ranked third; according to the total data, their share was 17.5%, whereas it ranged from 14.3% to 22.5% in other years of observation. EIEC detection rate ranged from 11.1% to 14.1% with an average of 11.8%. STEC findings were rarer compared to other DEC pathotypes, cumulatively accounting for 5.1% (a range from 1.4% to 13.9%).

According to the cumulative data, genetic determinants of one pathotype were identified in 69.8% of cases (mono-infection of DEC). One in three (30.2%) of those surveyed exhibited a coinfection as virulence markers of several DEC pathotypes were found simultaneously (Table 2).

In 2022, 53 DEC strains, were isolated and studied by culture method, including 33 EA_gEC, 10 EPEC, 8 ETEC, 1 STEC, and 1 EIEC. The strains were characterized by typical species features of *Escherichia coli*: they gave positive results with the methyl red test and negative results with the Voges–Proskauer test, did not split urea, did not form hydrogen sulfide or phenylalanine deaminase, did not ferment inositol and adonite, did not grow on Simmons citrate agar, were indole positive, fermented mannitol and glucose to acid and gas,

and had β-galactosidase activity. In terms of enzymatic properties, DEC strains showed variability with respect to carbohydrates: lactose, sucrose, arabinose, maltose, xylose, rhamnose; alcohols: dulcitol, sorbitol, salicin; amino acids: ornithine, lysine, and arginine. These variable properties did not allow to differentiate DEC pathotypes except for the EIEC strain, which did not ferment lactose and sucrose and did not decarboxylate lysine, and the STEC strain, which did not ferment sorbitol and gave a negative reaction

Table 1. Frequency of detection of DEC genetic determinants in individuals of various ages with diarrheal syndrome residing in the Republic of Guinea

Year	Age	Number of samples	Genetic determinants of DEC		95% CI
			n	%	
2019	0–5	8	8	100.0	63.1–100.0
	6–17	20	9	45.0	23.1–66.7
	18 and older	89	21	23.6	15.2–33.8
	Total	117	38	32.5	24.1–41.76
2020	0–5	8	8	100.0	63.1–100.0
	6–17	14	8	57.1	28.9–82.3
	18 and older	151	83	54.9	46.7–63.1
	Total	173	99	57.2	49.5–64.7
2021	0–5	41	37	90.2	76.9–97.3
	6–17	56	34	60.7	46.8–73.5
	18 and older	241	110	45.6	39.2–52.2
	Total	338	181	54.4	48.1–58.9
2022	0–5	15	13	86.7	59.5–98.3
	6–17	38	18	47.4	31.0–64.2
	18 and older	43	25	58.1	42.1–73.0
	Total	96	56	58.3	47.8–68.3
2019–2022	0–5	72	66	91.7	82.7–96.9
	6–17	128	69	53.9	44.9–62.8
	18 and older	524	239	45.6	41.3–50.0
	Total	724	374	51.7	47.9–55.4

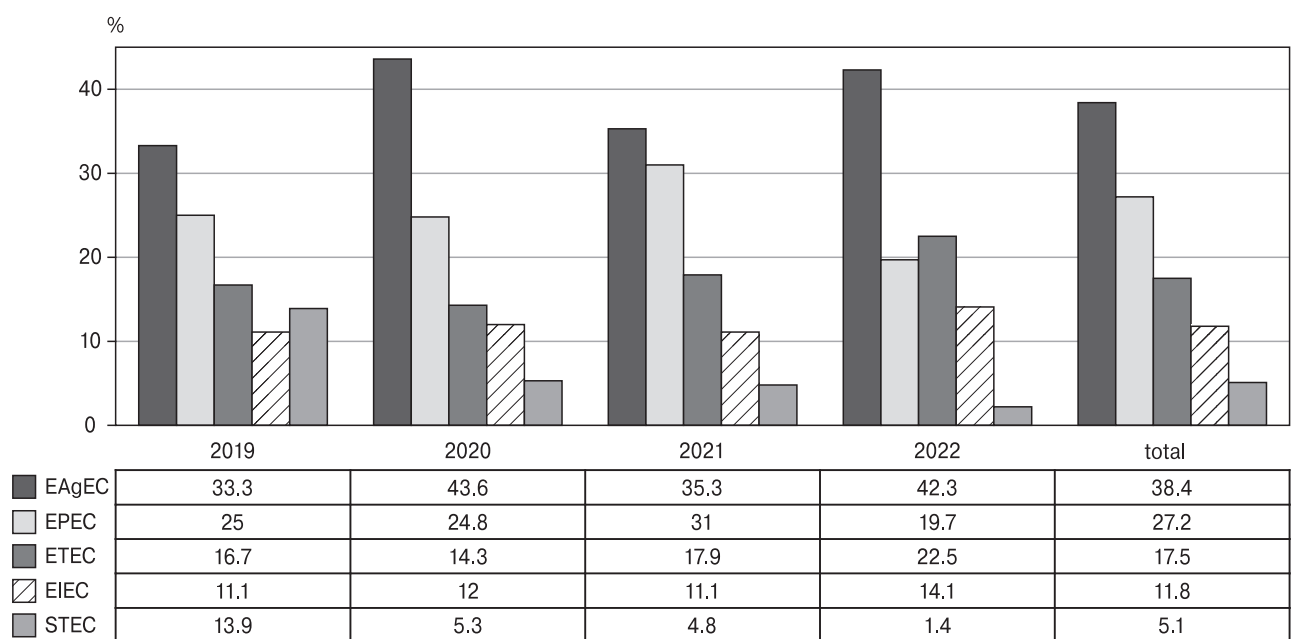


Figure 1. Structure of *E. coli* infections in the Republic of Guinea, 2019–2022

with β -galactosidase test; these properties can be considered as a phenotypic “mark” of the EIEC and STEC strains of the serological variant O157:H7.

The results of determining the susceptibility to antibiotics of all DEC strains and separately by pathotypes are shown in Fig. 2 and Table 3. According to the cumulative data, there was one strain belonging to the ETEC pathotype that was susceptible to all test drugs. Susceptibility to ampicillin persisted in six (11.3%) strains. To cephalosporins (ceftazidime, cefotaxime, cefepime) 73.6%, 75.5% and 73.6% of the strains, were susceptibility. Pharmacodynamic benefits of inhibitor-protected amoxicillin-clavulanic acid for cephalosporins, were not identified. All the strains were susceptible to meropenem. 66.0% and 98.1% of strains were susceptible to drugs of the group of quinolones (nalidixic acid) and fluoroquinolones (ciprofloxacin). Of the aminoglycosides, amikacin was more active, for 100% of the tested strains were susceptible to it. Tobramycin and gentamicin showed lower susceptibility of 86.8% and 83.0%, respectively. 34.0% and 28.3% of the studied strains remained susceptible to drugs of the tetracycline groups and trimethoprim-sulfamethoxazole. The proportion of strains susceptible to chloramphenicol and nitrofurantoin was 96.2% and 100%, respectively. The DEC characterized by multiple resistance to three or more classes of antibiotics (MDR phenotype) were 54.7%. No strains XDR were found.

Strains of the EIEC and STEC stayed 100% susceptible to all antibiotics except for ampicillin. Among the ETEC strains, 100% were susceptible to ciprofloxacin, aminoglycosides (gentamicin, tobramycin) and chloramphenicol. Cephalosporins (ceftazidime, cefotaxime, cefepime) and nalidixic acid showed the susceptibility of 87.5%. Ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole showed the least activity in this pathogroup — only 12.5% of strains were susceptible to these antibiotics. The EPEC strains were characterized by 100% susceptibility to cephalosporins, ciprofloxacin, and tobramycin. 90.0% and 60.0% of strains were susceptible to gentamicin and nalidixic acid, respectively. 40.0% of strains remained susceptible to ampicillin, amoxicillin/clavulanate and tetracycline. Trimethoprim-sulfamethoxazole showed the least activity in this pathogroup, with 30% of the strains being susceptible.

The EA_gEC strains compared to the strains of other DEC pathotypes were characterised by reduced susceptibility to all test antibiotics. In the group of β -lactam antibiotics, the greatest activity was detected in cephalosporins (60.3%) compared to inhibitor-protected aminopenicillin (30.3%) and ampicillin with only 3% of susceptible strains. Susceptibility to drugs of the quinolone/fluoroquinolone group (nalidixic acid/ciprofloxacin) was noted in 60.6% and 97.0% of strains. The activity of aminoglycosides (gentamicin and tobramycin) was found in 75.8%

Table 2. Genetic determinants of different DEC pathotypes based on the results of laboratory molecular diagnostics of *E. coli* infections

DEC pathotypes	2019		2020		2021		2022		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Mono-infection of DEC										
EA _g EC	10	26.3	35	35.4	40	21.7	18	32.1	103	27.5
EPEC	7	18.4	19	19.2	48	26.1	9	16.1	83	22.2
ETEC	4	10.5	6	6.1	17	9.2	5	8.9	32	8.6
EIEC	2	5.3	7	7.1	13	7.1	10	17.9	32	8.6
STEC	4	10.5	3	3.0	4	2.1	0	0	11	2.9
Total mono-infection	27	71.1	70	70.7	122	66.3	42	75.0	261	69.8
Coinfection of DEC										
EA _g EC+EPEC	2	5.3	7	7.1	18	9.8	4	7.1	31	8.3
EA _g EC+ETEC	2	5.3	5	5.1	15	8.2	1	1.8	23	6.1
EA _g EC+EIEC	2	5.3	5	5.1	8	4.3	5	8.9	20	5.3
EA _g EC+STEC	1	2.6	2	2.0	6	3.3	1	1.8	10	2.7
EPEC+ETEC	1	2.6	3	3.0	5	2.7	1	1.8	10	2.7
EPEC+EIEC	1	2.6	1	1.0	1	0.5	0	0	3	0.8
ETEC+EIEC	0	0	1	1.0	1	0.5	1	1.8	3	0.8
EA _g EC+EPEC+ETEC	0	0	1	1.0	1	0.5	1	1.8	3	0.8
EA _g EC+EPEC+EIEC	0	0	1	1.0	0	0	0	0	1	0.3
EA _g EC+ETEC+EIEC	0	0	0	0	1	0.5	0	0	1	0.3
EA _g EC+ETEC+STEC	0	0	2	2.0	0	0	0	0	2	0.5
EPEC+ETEC+EIEC	1	2.6	1	1.0	2	1.1	0	0	4	1.1
EA _g EC+EPEC+ETEC+EIEC	0	0	0	0	1	0.5	0	0	1	0.3
Total coinfection	10	26.3	29	29.3	59	32.1	14	25.0	113	30.2

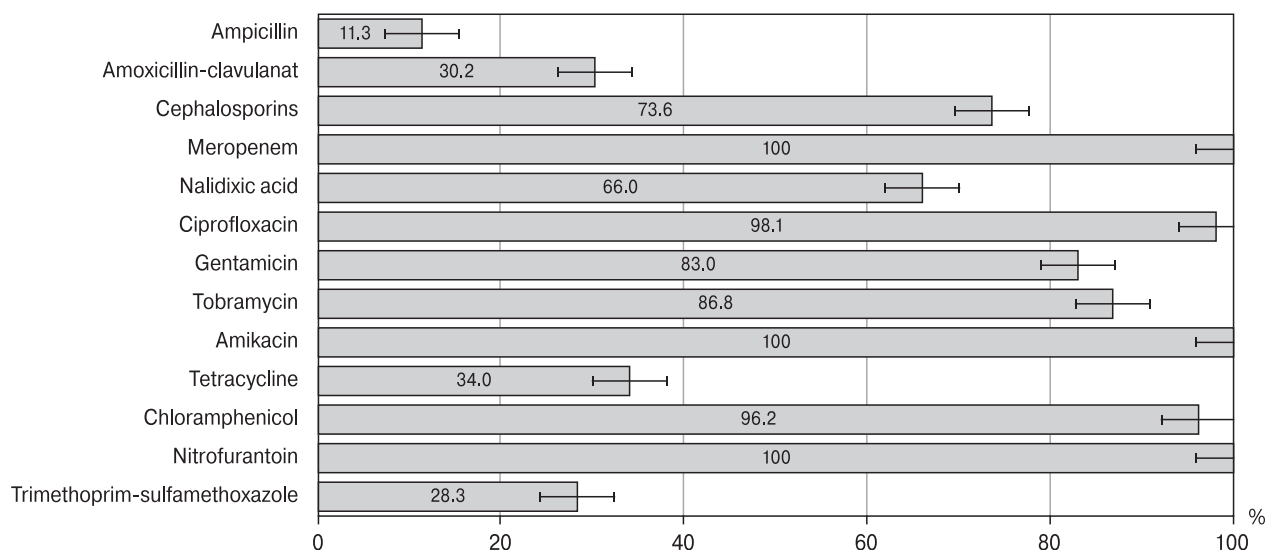


Figure 2. Antimicrobial agent susceptibility in DEC strains

Table 3. Susceptibility features in strains of various DEC pathotypes

Antimicrobial agent	DEC pathotypes, n = 53									
	EA _g EC n = 33		EPEC n = 10		ETEC n = 8		EIEC n = 1		STEC n = 1	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Ampicillin	1	3.0	4	40.0	1	12.5	0	0	0	0
Amoxicillin/clavulanate	10	30.3	4	40.0	1	12.5	1	100.0	0	0
Ceftazidime	20	60.6	10	100.0	7	87.5	1	100.0	1	100.0
Cefotaxime	21	63.6	10	100.0	7	87.5	1	100.0	1	100.0
Cefepime	20	60.6	10	100.0	7	87.5	1	100.0	1	100.0
Nalidixic acid	20	60.6	6	60.0	7	87.5	1	100.0	1	100.0
Ciprofloxacin	32	97.0	10	100.0	8	100.0	1	100.0	1	100.0
Gentamicin	25	75.8	9	90.0	8	100.0	1	100.0	1	100.0
Tobramycin	26	78.8	10	100.0	8	100.0	1	100.0	1	100.0
Tetracycline	12	36.4	4	40.0	1	12.5	0	0	1	100.0
Chloramphenicol	31	93.9	10	100.0	8	100.0	1	100.0	1	100.0
Trimethoprim-sulfamethoxazole	10	30.3	3	30.0	1	12.5	0	0	1	100.0

and 78.8% of EA_gEC. As for phenicols, tetracyclines and trimethoprim-sulfamethoxazole, susceptibility was detected in 93.9%, 36.4%, and 30.3% of strains, respectively.

Discussion

According to the World Bank, among the four leading causes of impact on humanity caused by all diseases and injuries, three are classified as infectious and parasitic diseases (diarrhea, intestinal helminthiasis, and tuberculosis) [19]. 1.9 million children die every year, accounting for 18% of all child deaths in this age group and meaning that over 5000 children die every day from diarrheal diseases [17, 20, 24, 26, 27]. Studies conducted in the Republic of Guinea found that the share of *E. coli* infections in the etiological structure of acute intestinal infections amounted to 51.7% in 2019–2022. Analysis of the age structure showed that infants and young

children (0–5 years) are the most exposed group (91.7%), whereas almost every second child of school age (53.9%) and persons over 18 years of age (45.6%) had DEC as the key acute intestinal infection cause.

The use of molecular methods made it possible to assess the structure of *E. coli* infections in different age groups of the population in the Republic of Guinea and to establish the circulation of strains of all known DEC pathotypes. According to the total data, the structure of *E. coli* infections in all years of observation was dominated by EA_gEC strains, which accounted for 38.4%. In the average annual structure, EPEC, ETEC, EIEC and STEC accounted for 27.2%, 17.5%, 11.8%, and 5.1%, respectively. Studies conducted in Latin America, Asia, Africa, and the former socialist countries of Eastern Europe have shown that EA_gEC is more likely than other bacterial pathogens to cause diarrhea in children [14]. Evidence from the United States, Europe, and Israel also suggests that EA_gEC often causes diarrheal dis-

eases in children [4, 9]. In the United States, the incidence of EA_gEC-related *E. coli* infections is higher in young children than campylobacteriosis and salmonellosis [12].

Analysis of DEC genetic determinants made it possible to establish that, in 2019–2022, *E. coli* infections in patients of the Republic of Guinea were characterized by *E. coli* mono-infection (genetic determinants of one specific pathogroup) in 69.8% of cases. In every third examined patient (30.2%), virulence markers of several DEC pathotypes were found.

A study of the susceptibility of DEC strains to antibiotics in the Guinean population showed that 100% of the strains were susceptible to meropenem, amikacin, and nitrofurantoin. The activity of other antibiotics ranged from 11.3% for ampicillin, 28.3% for trimethoprim-sulfamethoxazole, and 34.0% for tetracycline up to 73.6% for cephalosporins, 84.0% for aminoglycosides, and 98.1% for fluorinated quinolones.

Conclusion

The study confirmed the relevance of diarrheagenic *E. coli* for the population in the Republic of Guinea, as well as in other African countries [1, 11, 10, 13, 16, 22]. Laboratory diagnostics of said pathogens is possible only using molecular genetic methods. To reduce the burden of diarrheal diseases in the Republic of Guinea, it may be necessary to conduct targeted epidemiological and microbiological studies to identify DEC, study the contamination of the environment, including water and food, and identify risk factors.

Decreased susceptibility of DEC to antibiotics is an unfavourable prognostic sign, indicating a significant decrease in the efficiency of antibiotics used to treat acute intestinal infections, and confirms the need to introduce constant monitoring of the development of *E. coli* pathogen resistance in the population.

References

1. Aijuka M., Santiago A.E., Giron J.A., Nataro J.P., Buys E.M. Enteroaggregative *Escherichia coli* is the predominant diarrheagenic *E. coli* pathotype among irrigation water and food sources in South Africa. *Int. J. Food. Microbiol.*, 2018, vol. 2, pp. 44–51. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.018
2. Alkofide H., Alhammad A.M., Alruwaili A., Aldemerdash A., Almangour T.A., Alsuwayegh A., Almoqbel D., Albati A., Alsaud A., Enani M. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant enterobacteriaceae: prevalence, treatments, and outcomes — a retrospective cohort study. *Infect. Drug. Resist.*, 2020, vol. 24, no. 13, pp. 4653–4662. doi: 10.2147/IDR.S283488
3. Christaki E., Marcou M., Tofarides A. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. *J. Mol. Evol.*, 2020, vol. 88, no. 1, pp. 26–40. doi: 10.1007/s00239-019-09914-3
4. Dattani S., Spooner F., Ritchie H., Roser M. Diarrheal diseases. *Our World in Data*, 2023. URL: <https://ourworldindata.org/diarrheal-diseases> (17.07.2023)
5. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 2018, vol. 392, no. 10159, pp. 1736–1788. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7
6. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 2018, vol. 392, no. 10159, pp. 1789–1858. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32279-7
7. Gil-Gil T., Laborda P., Sanz-García F., Hernando-Amado S., Blanco P., Martínez J.L. Antimicrobial resistance: a multifaceted problem with multipronged solutions. *Microbiologyopen*, 2019, vol. 8, no. 11: e945. doi: 10.1002/mbo3.945
8. Gomes T.A.T., Elias W.P., Scaletsky I.C.A., Guth B.E.C., Rodrigues J.F., Piazza R.M.F., Ferreira L.C.S., Martinez M.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian J. Microbiol.*, 2016, vol. 47, pp. 3–30. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.015
9. Hebbelstrup Jensen B., Adler Sørensen C., Hebbelstrup Rye Rasmussen S., Rejkjær Holm D., Friis-Møller A., Engberg J., Mirsepasi-Lauridsen H.C., Struve C., Hammerum A.M., Porsbo L.J., Petersen R.F., Petersen A.M., Krogfelt K.A. Characterization of diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* in Danish adults-antibiotic treatment does not reduce duration of diarrhea. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2018, vol. 27, no. 8: 306. doi: 10.3389/fcimb.2018.00306
10. Ifeanyi C.I., Ikeneche N.F., Basse B.E., Al-Gallas N., Ben Aissa R., Boudabous A. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes isolated from children with diarrhea in the Federal Capital Territory Abuja, Nigeria. *J. Infect. Dev. Ctries*, 2015, vol. 9, no. 2, pp. 165–174. doi: 10.3855/jidc.5528
11. Iijima Y., Oundo J.O., Hibino T., Saidi S.M., Hinenoya A., Osawa K., Shirakawa T., Osawa R., Yamasaki S. High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* among children with diarrhea in Kenya. *Jpn J. Infect. Dis.*, 2017, vol. 70, no. 1, pp. 80–83. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.064
12. Jenkins C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2018, vol. 416, pp. 27–50. doi: 10.1007/82_2018_105
13. Khairy R.M.M., Fathy Z.A., Mahrous D.M., Mohamed E.S., Abdelrahim S.S. Prevalence, phylogeny, and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* pathotypes isolated from children less than 5 years old with community acquired diarrhea in Upper Egypt. *BMC Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 1: 908. doi: 10.1186/s12879-020-05664-6
14. López-Vélez R., Lebens M., Bundy L., Barriga J., Steffen R. Bacterial travellers' diarrhea: a narrative review of literature published over the past 10 years. *Travel Med. Infect. Dis.*, 2022, vol. 47: 102293. doi: 10.1016/j.tmaid.2022.102293
15. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, vol. 18, no. 3, pp. 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

16. Manhique-Coutinho L., Chiani P., Michelacci V., Taviani E., Bauhofer A.F.L., Chissaque A., Cossa-Moiane I., Sambo J., Chilaúle J., Guimarães E.L., Salência J., Cassocera M., Bero D.M., Langa J.P., de Deus N. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from children with diarrhea: A cross-sectional study in four provinces of Mozambique: Diarrheagenic *Escherichia coli* in Mozambique. *Int. J. Infect. Dis.*, 2022, vol. 121, pp. 190–194. doi: 10.1016/j.ijid.2022.04.054
17. Mernie G., Kloos H., Adane M. Prevalence of and factors associated with acute diarrhea among children under five in rural areas in Ethiopia with and without implementation of community-led total sanitation and hygiene. *BMC Pediatr.*, 2022, vol. 22, no. 1: 148. doi: 10.1186/s12887-022-03202-8
18. Tang K.W.K., Millar B.C., Moore J.E. Antimicrobial Resistance (AMR). *Br. J. Biomed. Sci.*, 2023, vol. 80: 11387. doi: 10.3389/bjbs.2023.11387
19. The World Bank. Under-five deaths data by country. 2019. URL: <https://data.worldbank.org/indicator/SH.DTH.MORT> (17.07.2023)
20. United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF). Diarrhea. 2022. URL: <https://data.unicef.org/topic/child-health/diarrheal-disease> (17.07.2023)
21. Vorlasane L., Luu M.N., Tiwari R., Imoto A., Sato M., Huy N.T., Kamiya Y., Moji K. The clinical characteristics, etiologic pathogens and the risk factors associated with dehydration status among under-five children hospitalized with acute diarrhea in Savannakhet Province, Lao PDR. *PLoS One*, 2023, vol. 18, no. 3: e0281650. doi: 10.1371/journal.pone.0281650
22. Wolde D., Tilahun G.A., Kotiso K.S., Medhin G., Eguale T. The burden of diarrheal diseases and its associated factors among under-five children in Welkite Town: a community based cross-sectional study. *Int. J. Public Health*, 2022, vol. 67: 1604960. doi: 10.3389/ijph.2022.1604960
23. Workie G.Y., Akalu T.Y., Baraki A.G. Environmental factors affecting childhood diarrheal disease among under-five children in Jamma district, South Wello zone, Northeast Ethiopia. *BMC Infect. Dis.*, 2019, vol. 19, no. 1: 804. doi: 10.1186/s12879-019-4445-x
24. WGO. Acute diarrhea in adults and children: a global perspective. 2012. URL: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/acute-diarrhea/acute-diarrhea-english> (17.07.2023)
25. WHO. Antimicrobial resistance. 17.11.2021. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (17.07.2023)
26. WHO. Diarrheal disease. 02.05.2017. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrheal-disease> (17.07.2023)
27. WHO. Ending preventable child deaths from pneumonia and diarrhea by 2025. The integrated Global Action Plan for Pneumonia and Diarrhea (GAPPD). 2013. URL: <https://www.who.int/news/item/13-01-2017-ending-preventable-child-deaths-from-pneumonia-and-diarrhea-by-2025> (17.07.2023)
28. WHO. Global Antimicrobial Resistance System (GLASS). URL: <https://www.who.int/initiatives/glass> (17.07.2023)
29. Zhou S.X., Wang L.P., Liu M.Y., Zhang H.Y., Lu Q.B., Shi L.S., Ren X., Wang Y.F., Lin S.H., Zhang C.H., Geng M.J., Zhang X.A., Zhu Y.L., Li Z.J., Fang L.Q., Liu W., Yang W.Z. Characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* among patients with acute diarrhea in China, 2009–2018. *J. Infect.*, 2021, vol. 83, no. 4, pp. 424–432. doi: 10.1016/j.jinf.2021.08.001

Авторы:

Макарова М.А., д.м.н., ведущий 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;

Балдэ Р., научный сотрудник отдела бактериологии НИИ прикладной биологии Гвинеи, г. Киндия, Гвинейская Республика;

Буаро М., профессор, генеральный директор Научно-исследовательского института прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика;

Матвеева З.Н., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Кафтырева Л.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник группы эпидемиологии брюшного тифа ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Makarova M.A., DSc (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;

Balde R., Researcher, Department of Bacteriology Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea;

Boiro M., Professor, General Director of the Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea;

Matveeva Z.N., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Kaftyreva L.A., DSc (Medicine), Leading Researcher, Typhoid Epidemiology Research Group, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Department of Medical Microbiology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

БАКТЕРИЕМИИ И ИНФЕКЦИИ ЦНС У ДЕТЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

З.З. Садеева¹, И.Е. Новикова¹, А.В. Лазарева¹, Н.М. Алябьева¹, О.В. Карасева^{1,2},
О.Г. Янюшкина², М.Г. Вершинина¹, А.П. Фисенко¹

¹ ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

Резюме. *Klebsiella pneumoniae* является одним из наиболее значимых и опасных для жизни возбудителей внутрибольничных инфекций. Этот оппортунистический микроорганизм может вызывать инфекции кровотока, респираторного тракта, мочевыводящих путей, кожи и мягких тканей, воспаление мозговой оболочки головного и спинного мозга, приводя к увеличению госпитальной летальности. Целью нашего исследования было ретроспективное изучение молекулярно-генетических характеристик *K. pneumoniae*, выделенных из образцов крови и ликвора, а также описание клинических особенностей при бактериемии и инфекции ЦНС. По результатам оценки клинических данных изоляты *K. pneumoniae* были выделены от 64 детей, наблюдавшихся с хирургической патологией (врожденные пороки сердца — 30%, абдоминальная патология — 39%, тяжелая сочетанная травма — 12%) и с соматическими заболеваниями, сопровождающимися антибактериальной и/или глюкокортикостероидной терапией — 14%. Минимальные подавляющие концентрации антибиотиков определяли методом серийных микроразведений в бульоне. Карбапенемазы выявляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Определение генов вирулентности и капсульных серотипов K1/K2 проводили методом мультиплексной ПЦР. Биопленки выращивали с использованием плоскодонных полистироловых планшетов с последующей окраской, фиксированием, элюированием и детекцией результатов. Популяционное разнообразие оценивали методом мультилокусного сиквенс-типирования. Бактериемии и инфекции ЦНС, ассоциированные с *K. pneumoniae*, в 25% случаев завершились летальным исходом. Значительная часть изолятов продемонстрировала фенотип широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) — 43%, фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) проявили 16% изолятов. Ген цефалоспоринолазы *bla*_{CTX-M} был обнаружен у 85% штаммов. Главной детерминантой устойчивости к карбапенемам был ген *bla*_{OXA-48} (33%); у 9% штаммов выявлен ген *bla*_{NDM}. Сочетание *bla*_{OXA-48} и *bla*_{NDM} обнаружено у 7% изолятов. Изучение продукции биопленок показало, что умеренную способность к образованию биопленок проявлял 61%, сильную — 21% и слабую — 15% изолятов. Два изолята (3%) не образовывали биопленок. Гены вирулентности *entB* и *mrkD* были выявлены у 100% изолятов, *ybtS* — у 78%. У 18% штаммов определялся ген

Адрес для переписки:

Садеева Зульфияр Закиевна
119296, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2,
ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр
здоровья детей МЗ РФ.
Тел.: 8 977 129-31-01. E-mail: zulfiryasadeeva@yandex.ru

Contacts:

Zulfirya Z. Sadeeva
119296, Russian Federation, Moscow, Lomonosovsky pr., 2,
National Medical Research Center for Children's Health,
Ministry of Health of the Russian Federation.
Phone: +7 977 129-31-01. E-mail: zulfiryasadeeva@yandex.ru

Для цитирования:

Садеева З.З., Новикова И.Е., Лазарева А.В., Алябьева Н.М.,
Карасева О.В., Янюшкина О.Г., Вершинина М.Г., Фисенко А.П.
Бактериемии и инфекции ЦНС у детей, ассоциированные с *Klebsiella pneumoniae*: молекулярно-генетическая характеристика и клинические особенности // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1117–1128.
doi: 10.15789/2220-7619-PBA-14482

Citation:

Sadeeva Z.Z., Novikova I.E., Lazareva A.V., Alyabyeva N.M., Karaseva O.V.,
Yanushkina O.G., Vershinina M.G., Fisenko A.P. Pediatric bacteremia and
CNS infections associated with *Klebsiella pneumoniae*: molecular genetic
characteristics and clinical features // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1117–1128.
doi: 10.15789/2220-7619-PBA-14482

iutA. Два изолята показали наличие гена *kfu*. К серотипу K2 принадлежали семь изолятов. У изученных нами изолятов *K. pneumoniae* было обнаружено 27 различных генотипов. Наиболее часто встречающимися были: ST307 — 21%, ST395 — 12%, ST48 — 7%, ST39 — 6% и ST29 — 6%. Инфекции кровотока и центральной нервной системы, ассоциированные *K. pneumoniae*, имеют большое значение в клинической практике. Этот микроорганизм способен длительно сохраняться на биотических и абиотических поверхностях, обладает широкой природной и приобретенной резистентностью к антибиотикам.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, бактериемия, нозокомиальные инфекции, резистентность, вирулентность, сепсис.

PEDIATRIC BACTEREMIA AND CNS INFECTIONS ASSOCIATED WITH *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*: MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS AND CLINICAL FEATURES

Sadeeva Z.Z.^a, Novikova I.E.^a, Lazareva A.V.^a, Alyabyeva N.M.^a, Karaseva O.V.^{a,b}, Yanushkina O.G.^b, Vershinina M.G.^a, Fisenko A.P.^a

^a National Medical Research Center for Children's Health of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^b Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma, Department of Public Health of Moscow, Moscow, Russian Federation

Abstract. *Klebsiella pneumoniae* is one of the most significant and life-threatening pathogen of nosocomial infections. This opportunistic microorganism can cause infections of the bloodstream, respiratory tract, urinary tract, skin and soft tissues, inflammation of meninges of the brain and spinal cord, leading to elevated hospital mortality. The purpose of our study was a retrospective analysis of molecular genetic characteristics of *K. pneumoniae* isolated from blood and liquor samples as well as to describe clinical features in bacteremia and CNS infections. According to the results of assessed clinical data, *K. pneumoniae* isolates were selected from 64 children suffered from surgical pathology (congenital heart defects — 30%, abdominal pathology — 39%, severe combined trauma — 12%) and somatic diseases accompanied by antibacterial and/or glucocorticosteroid therapy — 14%. The minimum suppressive concentrations of antibiotics were determined by the broth micro-dilution method. Carbapenemases were detected by real time polymerase chain reaction. Virulence genes and capsule serotypes K1/K2 were assessed by multiplex PCR. Biofilms were grown using flat-bottomed polystyrene plates, followed by coloring, fixation, elution and data detection. The population diversity was assessed by multilocus sequence typing. Bacteremia and CNS infections associated with *K. pneumoniae* were fatal in 25% of cases. A substantial portion of the isolates demonstrated the phenotype of extremely drug resistance (XDR) — 43%, the phenotype of multidrug resistance (MDR) was shown in 16% of the isolates. The *bla*_{CTX-M} cephalosporinase gene was found in 85% of the strains. The main determinant of resistance to carbapenems was the *bla*_{OXA-48} gene (33%); the *bla*_{NDM} gene was detected in 9% of strains. The combination of *bla*_{OXA-48} and *bla*_{NDM} was found in 7% of isolates. The study of biofilm production showed that moderate ability to form biofilms was shown in 61%, strong — 21%, and weak — 15% isolates. Two isolates (3%) did not form biofilms. The virulence genes *entB* and *mrkD* were detected in 100% of isolates, *ybtS* — in 78%. The *iutA* gene was found in 18% of the strains. Two isolates showed the presence of the *kfu* gene. Seven isolates belonged to the K2 serotype. 27 different genotypes were found in *K. pneumoniae* isolates examined. The most common were: ST307 — 21%, ST395 — 12%, ST48 — 7%, ST39 — 6% and ST29 — 6%. Infections of the bloodstream and central nervous system associated with *K. pneumoniae* have great importance in clinical practice. This microorganism is able to long persist on biotic and abiotic surfaces, has a wide natural and acquired resistance to antibiotics.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, bacteremia, nosocomial infections, resistance, virulence, sepsis.

Введение

Klebsiella pneumoniae является одним из наиболее значимых и опасных для жизни возбудителей внутрибольничных инфекций. Этот оппортунистический микроорганизм может вызывать инфекции кровотока, респираторного тракта, мочевыводящих путей, кожи и мягких тканей, воспаление мозговой оболочки головного и спинного мозга, приводя к увеличению госпитальной летальности, особенно у иммуносупрессированных пациентов, новорожденных и пожилых пациентов [19]. *K. pneumoniae* наряду с другими представителями порядка *Enterobacterales* имеет множество факторов, спо-

собствующих колонизации организма хозяина, а также способность к приобретению устойчивости к многим классам антибиотиков [6]. Геном *K. pneumoniae* может содержать большое количество детерминант резистентности, среди них особое значение имеют гены, кодирующие ферменты, разрушающие антибиотики. С точки зрения эпидемиологии наибольшую роль играют карбапенемазы групп: KPC, OXA-48, NDM и β-лактамазы расширенного спектра действия CTX-M типа [9, 18]. Распространение множественно-резистентных *K. pneumoniae* часто ассоциировано с международными клонами высокого риска, которые являются носителями генов карбапенемаз [24]. Изоляты, обладающие

устойчивостью ко многим группам антибиотиков, а также имеющие дополнительные факторы вирулентности, играют большую роль в высокой смертности при инфекциях, ассоциированных с нозокомиальными патогенами [10].

Целью данного исследования было ретроспективное изучение молекулярно-генетических характеристик *K. pneumoniae*, выделенных из образцов крови и ликвора, а также описание клинических особенностей при бактериемии и инфекции ЦНС.

Материалы и методы

Бактериальные культуры. В период с 2014 по 2021 г. из положительных гемокультур и проб ликвора были отобраны 67 изолятов *K. pneumoniae*, которые были выделены от пациентов из двух многопрофильных детских стационаров: ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (С1) — отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), ОРИТ новорожденных, соматические отделения, и НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы (С2) — ОРИТ. Образцы крови инкубировали в анализаторе гемокультур «BACTEC 9050» (Becton Dickinson, США), «BacT/ALERT» (bioMerieux, Франция) до фиксации роста микроорганизмов, затем пробу отсекали на плотные питательные среды для выделения чистой культуры возбудителя. Посевы производили на питательные среды: кровяной агар и Uri-select агар (BioRad, США), далее инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 24–48 ч. Идентификацию возбудителя проводили методом масс-спектрометрии MALDI-ToF (Bruker Daltonics, Германия).

Чувствительность к антибактериальным препаратам. Были определены минимальные подавляющие концентрации (МПК) следующих антибиотиков: меропенем, имипенем, колистин, азтреонам, тобрамицин, амикацин, гентамицин, фосфомицин, цефтазидим, цефепим, тикарциллин/клавуланат, пиперациллин/тазобактам, триметоприм/сульфаметоксазол, цiproфлоксацин. МПК антибиотиков определяли методом серийных микроразведений в бульоне Мюллера–Хинтон (bioMerieux, Франция), Sensititre™ (ThermoScientific, Великобритания). МПК меропенема определяли методом микроразведений в соответствии со стандартом (ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010). Результаты интерпретировали в соответствии с критериями Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам (EUCAST), версия 10.0 (EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, version 10.0, 2020, pp. 10–20).

Все изоляты были разделены на штаммы с множественной лекарственной устойчивостью

(МЛУ) и штаммы с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) в соответствии с рекомендациями [7]. Классификация базируется на чувствительности микроорганизмов к 6 группам антибиотиков: аминогликозидам (тобрамицин или гентамицин), пенициллинам (пиперациллин/тазобактам), карбапенемам (имипенем или меропенем), цефалоспорином (цефотаксим, цефтриаксон или цефтазидим), фторхинолонам (ципрофлоксацин), сульфаниламидам (триметоприм/сульфаметоксазол). Изоляты, проявляющие устойчивость к 3 или 4 перечисленным группам, классифицировали как МЛУ, штаммы, резистентные к 5 или 6 группам, относили к ШЛУ.

Выделение ДНК и определение генов карбапенемаз. Для выделения ДНК использовали суточную культуру. Бактериальную ДНК выделяли согласно инструкции производителя с использованием коммерческих наборов «ГК-экспресс» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Полученные образцы хранили до использования при температуре –20°C.

Выявление генов, отвечающих за продукцию цефалоспориноаз и карбапенемаз, проводили с использованием наборов с гибридным флуоресцентной детекцией «АмплиСенс ESBL CTX-M-FL» (CTX-M), «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL» (KPC, OXA-48), «АмплиСенс MDR MBL-FL» (IMP, NDM, VIM) производства ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Проведение ПЦР осуществляли согласно инструкции производителя. ПЦР проводили с помощью амплификатора «LightCycler 96» (Roche, Швейцария/Германия).

Определение генов вирулентности и капсульных серотипов K1/K2. Гены вирулентности и принадлежность к капсульным серотипам K1/K2 определяли методом мультиплексной ПЦР [4]. Было определено наличие следующих генов: *magA*, специфичного для серотипа K1; *rmpA*, регулирующего синтез мукоидного фенотипа; *entB*, ассоциированного с синтезом энтеробактина; *ybtS*, связанного с синтезом йерсиниебактина; *kfu*, ответственного за связывание трехвалентного железа; *iutA*, кодирующего транспортер аэробактина; *mrkD*, ассоциированного с фимбриальными адгезинами 3 типа; *allS*, связанного с метаболизмом аллантоина; *wzi*, специфичного для серотипа K2. Ген *entB* использовался в качестве положительного контроля, так как широко распространен у изолятов *K. pneumoniae*. Результаты оценивали проведением электрофореза в 2% агарозном геле. Последовательности праймеров для определения генов вирулентности и K1/K2 были описаны Comrain F. и соавт. [4].

Биопленкообразование. Анализ формирования биопленок на абиотической поверхности про-

водили с использованием сердечно-мозгового бульона (ВНВ; Becton Dickinson, США) по ранее описанной методике с модификациями [12].

Биопленки выращивали в 96-луночных полистироловых планшетах с плоским дном в трех повторях. Аликвоту 20 мкл бактериальной суспензии с мутностью 0,8 по МакФарланду вносили в лунки, содержащие 180 мкл ВНВ с последующей 24-часовой инкубацией при 37°C без перемешивания. После удаления бульона и планктонных клеток фиксировали биопленки добавлением 200 мкл 2,5% глутарового альдегида (инкубация 5 мин при комнатной температуре). Затем трижды промывали дистиллированной водой. Для окрашивания вносили 200 мкл кристаллического фиолетового (0,1% спиртовой раствор), инкубировали в течение 10 мин. После этого трижды промывали дистиллированной водой. Для растворения и обесцвечивания связанного красителя добавляли 200 мкл 95% этанола — инкубация 30 мин. Оптическую плотность итогового раствора измеряли при длине волны 590 нм с использованием планшетного считывателя «Infinite 200M» (Tecan, Австрия). Интенсивность биопленкообразования определяли согласно рекомендациям АРМИС 2007, Stepanović S. и соавт. [23].

Мультилокусное секвенирование-типирование (МЛСТ). Генотипирование штаммов *K. pneumoniae* проводили методом МЛСТ согласно схеме, предложенной Институтом Пастера (Париж) [5]. Был проведен анализ семи «генов домашнего хозяйства»: *rpoB* (бета-субъединицы РНК-полимеразы), *gapA* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы), *mdh* (малатдегидрогеназы), *pgi* (фосфоглюкозаизомеразы), *phoE* (фосфорина E), *infB* (фактора инициации трансляции 2), *tonB* (периплазматического энергетического трансдучера). Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с использованием программы SeqMan (DNASTAR Inc.) и затем сравнивали с аллельными профилями базы данных BIGSdb (<https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella>).

Оценка клинических данных. Ретроспективно были проанализированы клинические данные пациентов, из крови или ликвора которых была выделена *K. pneumoniae*.

Статистические методы. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ SPSS 20.0 (SPSS Statistics, США) и Microsoft Excel 2010. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Чувствительность к антибиотикам и фенотипы резистентности. Чувствительность к антимикробным препаратам изолятов *K. pneumoniae* представлена в табл. 1.

Фенотип МЛУ проявили 11 (16%) изолятов, фенотип ШЛУ имели 29 (43%) штаммов. При этом ШЛУ в сочетании с устойчивостью к колистину была выявлена у 17 (25%) штаммов. Достоверные различия по чувствительности к антибиотикам между двумя стационарами были определены только для ципрофлоксацина. Для изолятов из стационара С1 ципрофлоксацин *in vitro* был более эффективен, чем из стационара С2 ($p = 0,0247$).

Гены резистентности. Ген, отвечающий за продукцию цефалоспоринызы *bla*_{CTX-M}, был обнаружен у 57 изолятов, что составило 85%. Основной детерминантой устойчивости к карбапенемам был ген *bla*_{OXA-48} — частота его выявления составила 33%. Ген МБЛ (металло-β-лактамаза) *bla*_{NDM} обнаруживался значительно реже — у 9% изолятов. Комбинацию *bla*_{OXA-48} и *bla*_{NDM} имели 7% штаммов. Гены *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP} и *bla*_{VIM} найдены не были. Было определено, что *bla*_{NDM} достоверно чаще определялся в период с 2018 по 2021 гг. ($p = 0,003$).

Вирулентность. Все штаммы *K. pneumoniae* имели гены *entB* и *mrkD*. В значительной доле случаев определялся ген *ybtS* — 52 (78%). Аэробактин *iutA* был обнаружен у 12/67 (18%) штаммов. Способность к связыванию трехвалентного железа, кодируемая геном *kfu*, была характерна всего для двух изолятов (3%). Ген *wzi*, кодирующий капсульный серотип K2, был определен у семи изолятов *K. pneumoniae*. Штаммы, относящиеся к гипервирулентному серотипу K1, в нашем исследовании не встречались. Гены *rmpA* и *allS* не определялись ни у одного из изученных изолятов. Комбинации различных генов вирулентности у одного изолята представлены на рис. 1.

Биопленкообразование. Основная масса изолятов *K. pneumoniae* была способна к образованию биопленок. Всего два изолята (3%) не образовывали биопленок. Умеренную способность к образованию биопленок проявлял 41 (61%) изолят; сильную — 14 (21%) штаммов и слабую — 10 (15%) изолятов. Было определено, что в период с 2014 по 2017 г. чаще выявлялись изоляты, образующие сильные биопленки ($p = 0,0005$), а в период с 2018 по 2021 г. преобладали изоляты с умеренной способностью к образованию биопленок ($p = 0,002$).

Генотипирование. У изученных нами изолятов *K. pneumoniae* было обнаружено 27 различных генотипов. Наиболее частотными были: ST307 — 21%, ST395 — 12%, ST48 — 7%, ST39 — 6% и ST29 — 6% (рис. 2).

Основная масса резистентных к карбапенемам изолятов принадлежала к генотипам ST307, ST395, ST48, ST29, ST2975 и ST198. Устойчивые к колистину изоляты относились к генотипам ST395 (5/17), ST307 (4/17), ST2975 (3/17), по од-

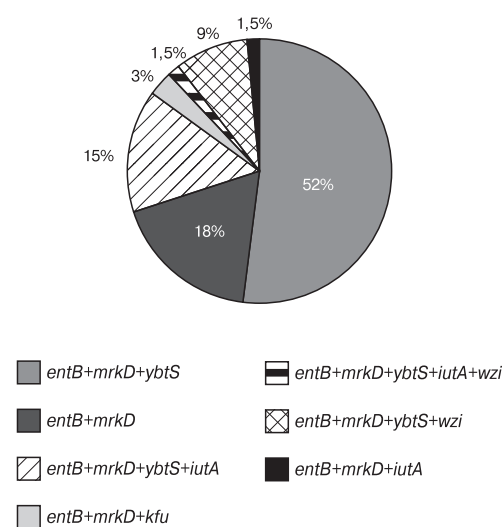
Таблица 1. Чувствительность *K. pneumoniae* к антимикробным препаратамTable 1. *K. pneumoniae* sensitivity to antimicrobial drugs

Антимикробный препарат Antimicrobial drug	Чувствительный Sensitive		Чувствительный при повышенной экспозиции Sensitive at increased exposure		Резистентный Resistant	
	n	%	n	%	n	%
Меропенем Meropenem	37	55	7	11	23	34
Имипенем Imipenem	39	58	5	8	23	34
Колистин Colistin	46	69	–	–	21	31
Азтреонам Aztreonam	6	9	–	–	61	91
Тобрамицин Tobramycin	8	12	–	–	59	88
Амикацин Amikacin	26	39	–	–	41	61
Гентамицин Gentamicin	16	24	–	–	51	76
Фосфомицин Fosfomycin	37	55	–	–	30	45
Цефтазидим Ceftazidime	5	8	–	–	62	92
Цефепим Cefepime	4	6	6	9	57	85
Тикарциллин/клавуланат Ticarillin/clavulanat	3	5	1	1	63	94
Пиперациллин/тазобактам Piperacillin/tasobactam	12	18	4	6	51	76
Триметоприм/сульфаметоксазол Trimethoprim/sulfamethoxazole	17	25	–	–	50	75
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	12	18	6	9	49	73

ному изоляту — к генотипам ST48, ST11, ST39, ST29, ST985. На рис. 3 представлены генотипы изолятов, обладающих карбапенемазами.

Из табл. 2 можно сделать вывод, что факторы, отвечающие за гипервирулентность изолятов, распространены в определенных генотипах. Так сидерофор аэробактин (*iutA*) в 10/12 случаев определялся у представителей ST307 ($p < 0,05$). Гипермукоидный гипервирулентный капсульный K2 серотип в шести из семи случаев был определен у изолятов ST395 ($p < 0,05$).

Представители ST307 были способны к формированию биопленок разной интенсивности: половина изолятов формировала умеренные биопленки, четыре изолята — сильные и три — слабые. Половина изолятов ST395 также формировала умеренные биопленки, три — слабые и один изолят не формировал биопленку. Изоляты ST48 имели сильные и умеренные биопленки. Два из трех изолятов ST2975 формировали умеренные биопленки и один — сильную. Все представители ST39, ST29, ST198, ST6, ST4 образовывали биопленки умеренной интенсивности. Оба изолята генотипа ST11 формирова-

Детерминанты вирулентности
Determinants of virulenceРисунок 1. Комбинации детерминант вирулентности у изолятов *K. pneumoniae*Figure 1. Combinations of virulence determinants in *K. pneumoniae* isolates

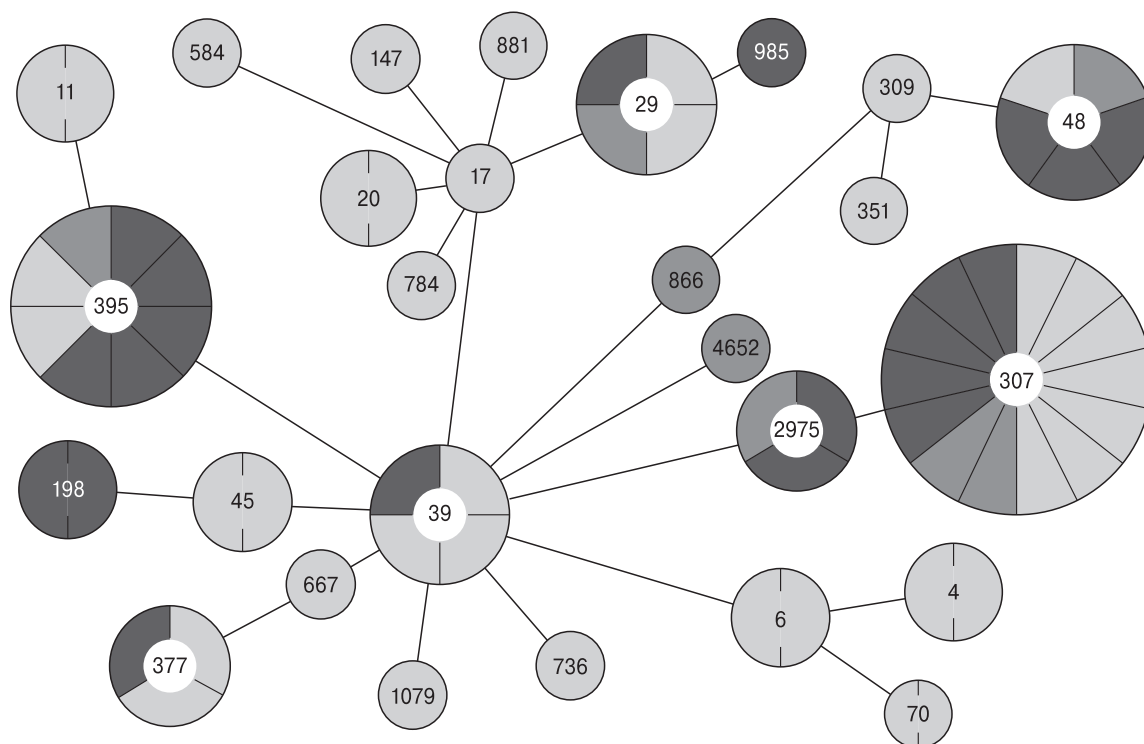


Рисунок 2. Генотиповой состав *K. pneumoniae* при бактериемии и инфекции ЦНС

Figure 2. *K. pneumoniae* genotype composition in bacteremia and CNS infection

Примечание. Светло-серым цветом обозначены изоляты, чувствительные к карбапенемам; серым — чувствительные при повышенной экспозиции; темно-серым — резистентные. Секторами обозначено количество изолятов в генотипе.

Note. Isolates sensitive to carbapenems are indicated in light grey; grey — sensitive at increased exposure; dark grey — resistant. Sectors indicate the number of isolates in the genotype.

ли сильные био пленки. Популяционная структура *K. pneumoniae* в разных отделениях по стационарам представлена в табл. 3.

В ОРИТ С1 в течение четырех лет, с 2015 по 2018 г. при бактериемии и инфекции ЦНС

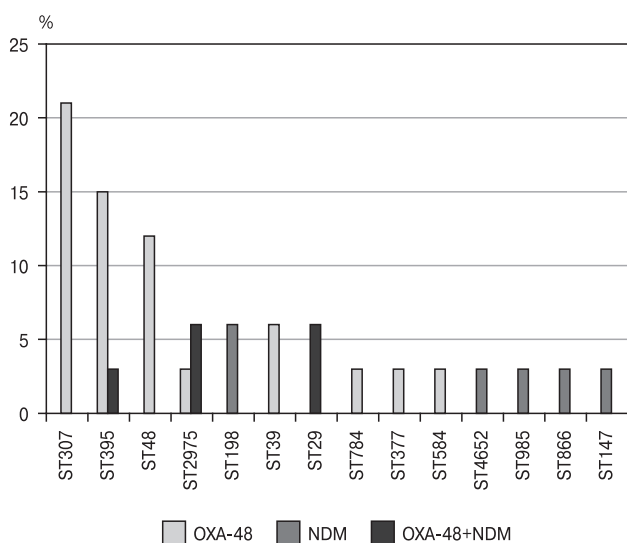


Рисунок 3. Распространенность карбапенемаз среди представителей различных генотипов

Figure 3. Carbapenemase prevalence among representatives of various genotypes

у детей часто выделялись *K. pneumoniae* с генотипом ST307. В 2018 г. появился его однолокусный вариант ST2975. Изоляты ST395 выделялись в 2017 и 2019 гг. Генотип ST29 встречался с 2018 по 2019 г. Изоляты с генотипами ST6, ST11, ST17, ST784, ST881, ST985 и ST4652 встречались только в этом отделении.

В ОРИТ новорожденных С1 в 2014 и 2015 гг. наблюдалось выделение *K. pneumoniae* с генотипом ST48. Изоляты ST395 определялись в 2018, 2019 и 2021 гг. Генотип ST39 встречался в 2018 и 2020 гг. Штаммы, имеющие ST20, были выделены в этом отделении в 2020 и 2021 гг. Генотипы ST20, ST198, ST309, ST351 и ST736 определялись только в ОРИТ новорожденных С1.

Спорадические случаи бактериемии в двух соматических отделениях С1 в 2017 и 2020 гг. ассоциированы с *K. pneumoniae* разных генотипов, которые не входят в число клонов высокого международного риска.

В ОРИТ С2 в 2016, 2019 и 2020 гг. определялись изоляты *K. pneumoniae* с генотипом ST395. В 2017 и 2019 гг. выделялись штаммы ST377. В 2020 г. был выявлен изолят с генотипом ST667, а в 2021 г. появился его однолокусный вариант ST39. Штаммы с генотипами ST70, ST147, ST377, ST584 и ST667 выделялись только из стационара С2.

Таблица 2. Детерминанты вирулентности у представителей различных генотипов K. pneumoniae

Table 2. Virulence determinants in representatives of various K. pneumoniae genotypes

Генотип (n) Genotype (n)	n	K2 (wzi)	ybtS	mrkD	entB	kfu	iutA
ST307 (14)	10		+	+	+		+
	4		+	+	+		
ST395 (8)	5	+	+	+	+		
	1		+	+	+		
	1			+	+		
	1	+	+	+	+		+
ST48 (5)	5		+	+	+		
ST39 (4)	4		+	+	+		
ST29 (4)	4		+	+	+		
ST2975 (3)	3		+	+	+		
ST377 (3)	3			+	+		
ST45 (2)	2		+	+	+		
ST198 (2)	2		+	+	+		
ST4 (2)	2		+	+	+		
ST6 (2)	2		+	+	+		
ST20 (2)	2			+	+		
ST11 (2)	2			+	+		
ST784 (1)	1		+	+	+		
ST309 (1)	1		+	+	+		
ST866(1)	1		+	+	+		
ST667 (1)	1		+	+	+		
ST147 (1)	1		+	+	+		
ST70 (1)	1			+	+		
ST17 (1)	1			+	+		
ST351 (1)	1			+	+		
ST985 (1)	1		+	+	+		
ST1079(1)	1			+	+		
ST4652 (1)	1			+	+	+	
ST736 (1)	1			+	+	+	
ST881 (1)	1	+	+	+	+		
ST584(1)	1			+	+		+
Всего Total	67	7 (10%)	52 (78%)	67 (100%)	67 (100%)	2 (3%)	12 (18%)

Таблица 3. Генотипическое разнообразие K. pneumoniae в отделениях в разные годы

Table 3. K. pneumoniae genotypic diversity in the departments in different years

Год Year	ОРИТ С1 ICU H1	ОРИТ новорожденных С1 ICU of newborns H1	Соматические отделения С1 Somatic departments H1	ОРИТ С2 ICU H2
2014	ST11++, ST48++	ST48+, ST307++	–	ST70+
2015	ST17+, ST307+++	ST48++, ST351+	–	–
2016	ST307++++, ST4652+	–	–	ST395+
2017	ST307++, ST395+, ST784+ (DLV** ST17), ST881+	–	ST4+	ST4+, ST45+, ST307++, ST377++
2018	ST6++, ST29+, ST307+, ST985+ (SLV* ST29), ST2975+ (SLV ST307)	ST29++, ST39+ ST198++, ST309+ ST395+, ST2975++ (SLV ST307)	–	–
2019	ST29+, ST395+	ST395+	–	ST395+, ST377+
2020	–	ST20+, ST39+	ST866+, ST1079+	ST395+, ST584+, ST667+ (SLV ST39)
2021	ST45+	ST20+, ST395+, ST736+	–	ST39++ (SLV ST667), ST147+

Примечание. * — однолокусный вариант; ** — двухлокусный вариант; «+» — частота выделения.

Note. * — a single-locus variant; ** — a two-locus variant; «+» — frequency of allocation.

Представители клонов высокого международного риска ST48, ST29, ST198, ST2975 (SLV 307) встречались только в стационаре С1. ST377 был характерен только для стационара С2. В то же время такие генотипы международного риска, как ST39, ST307 и ST395, были определены в обоих стационарах.

Клинические данные. По результатам оценки клинических данных изоляты *K. pneumoniae* были выделены от 64 детей в возрасте от 5 суток до 17 лет. Медиана возраста — 4 месяца (1 м; 12 м). Пациенты были разделены на 4 возрастные группы: I (0–1 год) — 46 детей (71,8%), II (1–3 лет) — 3 ребенка (4,7%), III (3–7 лет) — 3 ребенка (4,7%), IV (7–17 лет) — 12 детей (18,8%). Характеристика изолятов, выделенных от детей разных возрастных групп, отображена в табл. 4.

Штаммы *K. pneumoniae* были получены от детей, наблюдавшихся с хирургической патологией (врожденные пороки сердца — 30%, абдоминальная патология — 39%, тяжелая сочетанная травма — 12%) и с соматическими заболеваниями, сопровождающимися антибактериальной и/или глюкокортикостероидной терапией — 14%. Из 60 пациентов с положительной гемокультурой диагноз «Сепсис» был у 19 (32%), из них 10 имели неблагоприятный исход (всего было 16 неблагоприятных исходов). В четырех случаях положительные высевы *K. pneumoniae* были получены из образцов ликвора, при этом у двух пациентов с диагнозом «Менингит». Микробиологическая характеристика неблагоприятных исходов отображена в табл. 5.

При бактериемии с летальным исходом, ассоциированной с *K. pneumoniae*, 12 пациентов были в возрасте до одного года, два пациента — от года до семи лет, и два — от семи до 17 лет. 15 пациентов наблюдались с хирургической патологией, и один — с соматической, у 10 был выявлен сепсис.

Обсуждение

Результаты данного исследования подтверждают общую негативную тенденцию последних лет — возрастание уровня резистентности у изолятов *K. pneumoniae*. Инфекции кровотока и ЦНС, ассоциированные с карбапенем-резистентными *K. pneumoniae*, распространены среди пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии [29]. При изучении молекулярно-генетических характеристик штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из образцов крови и ликвора у детей, нами был обнаружен высокий уровень устойчивости штаммов к антимикробным препаратам. Множественно-резистентные и экстремально резистентные штаммы составляли 16 и 43% соответственно. Около четверти изолятов прояв-

ляли широкую лекарственную устойчивость, в том числе к колистину, который является последней линией терапии. В исследованиях наших китайских коллег распространенность множественно-резистентных *K. pneumoniae* при инфекциях кровотока варьируется от 18 до 61% [25]. В нашем исследовании до 88% изолятов *K. pneumoniae* проявляли устойчивость к аминогликозидам, 85% — к цефепиму, 91% — к азтреонаму. К карбапенемам, колистину и бисептолу были нечувствительны 34, 31 и 75% изолятов соответственно. Полученные результаты во многом отличаются от резистентности при инфекциях кровотока в США, где к аминогликозидам резистентны около 17%, к цефепиму — 9%, к азтреонаму — 16%, к меропенему — 9% и к бисептолу — 33% штаммов *K. pneumoniae*. При этом наши коллеги отмечают значительную роль множественно-резистентных изолятов *K. pneumoniae* при инфекциях кровотока [15]. Основной причиной резистентности к карбапенемам изолятов клебсиеллы из кровотока и ликвора была продукция карбапенемаз, в частности *bla_{OXA-48}*. Она распространена во многих странах [22], в том числе в России [1].

Ранее считалось, что бактерии, имеющие множественную резистентность, не способны проявлять гипервирулентность. В последние годы появляется много сообщений о выделении одновременно гипервирулентных и мультирезистентных штаммов *K. pneumoniae* [13, 16]. Эти штаммы могут представлять особую опасность для пациентов, поскольку способны вызывать тяжелые инфекции и длительно персистировать в организме пациента и в больничной среде. При изучении факторов вирулентности нами было обнаружено, что сидерофор энтеробактин определялся во всех клебсиеллах, как и во многих других исследованиях. Сидерофор иерсиниебактин *ybtS*, по результатам зарубежных работ, наиболее часто ассоциирован с инфекциями респираторного тракта, а у изолятов, выделенных из крови, встречается редко [3]. При этом в нашей работе 78% изолятов имели ген иерсиниебактина. Сидерофор аэробактин является одним из маркеров гипервирулентности [20]. Встречаемость гена аэробактина *iutA* достигает 56,8% у пациентов с менингитом [11]. При пиогенных абсцессах печени встречаемость этого фактора достигает 85,3% [28]. У исследованных нами изолятов аэробактин был выделен в 18%. Ген *mrkD*, кодирующий фимбрии 3 типа, отвечающие за биопленкообразование, встречался у всех изученных нами изолятов, это соотносится с данными других исследований [28]. Считается, что *K. pneumoniae*, относящиеся к K1/K2 серотипам, более вирулентные, чем представители других серотипов [20]. Мы не выя-

Таблица 4. Характеристика изолятов *K. pneumoniae* в разных возрастных группахTable 4. Characteristics of *K. pneumoniae* isolates in different age groups

Параметры Parameters		Группы Groups	Группа 1 Group 1 n = 46	Группа 2 Group 2 n = 3	Группа 3 Group 3 n = 3	Группа 4 Group 4 n = 12
Карбапенемазы Carbapenemases	ОXA-48		13	2	2	5
	NDM		5	–	–	1
	ОXA-48+NDM		4	–	–	1
Фенотип резистентности Resistance phenotype	Чувствительные Sensitive		8	–	–	1
	МЛУ MDR		8	1	–	1
	ШЛУ XDR		16	2	3	7
	ШЛУ+COL XDR+COL		14	–	–	3
Интенсивность биофленок Biofilm intensity	Нет биофленки No biofilm		–	–	–	2
	Слабая Weak		6	2	–	2
	Умеренная Moderate		31	1	2	5
	Сильная Strong		9	–	1	3
Вирулентность Virulence	Иерсиниебактин Yersiniebactin		36	2	2	10
	Аэробактин Aerobactin		8	2	1	1
	K2 серотип K2 serotype		5	–	–	2
	Система kfu System kfu		2	–	–	–
Генотипы (ST) Genotypes (ST)		307 (n = 10), 395 (n = 6), 48 (n = 5), 29 (n = 3), 2975 (n = 3), 11 (n = 2), 20 (n = 2), 39 (n = 2), 198, 4, 6, 45, 309, 351, 736, 784, 866, 881, 985, 4652	307 (n = 2), 377 (n = 1)	307 (n = 2), 377 (n = 1)	39 (n = 2), 395 (n = 2), 4, 29, 45, 70, 147, 584, 667, 1079	

Таблица 5. Характеристика *K. pneumoniae* при неблагоприятных исходах бактериемии и инфекции ЦНС (n = 16)Table 5. Characteristics of *K. pneumoniae* in unfavorable outcomes of bacteremia and CNS infection (n = 16)

Фенотип резистентности Resistance phenotype	Гены резистентности Resistance genes	Вирулентность Virulence	Биофленки Biofilms	ST*****
Чувствительные – 25% Sensitive – 25% ШЛУ* – 25% XDR* – 25% ШЛУ + R** к колистину – 50% XDR + R** to colistin – 50%	СТХ-М – 100% ОXA-48 – 31% NDM – 6% ОXA-48+NDM – 6%	Энтеробактин – 100% Enterobactin – 100% Фимбриальный адгезин – 100% Fimbrial adhesive – 100% Иерсиниебактин – 88% Yersiniebactin – 88% Аэробактин – 25% Aerobactin – 25% K2 капсульный серотип – 13% K2 capsule serotype – 13%	L*** – 13% M**** – 50% S***** – 37%	307 – 25% 395 – 13% 11 – 13% 6, 29, 39, 45, 48, 784, 985, 2975 – по 6% 6, 29, 39, 45, 48, 784, 985, 2975 – by 6%

Примечание. * – широкая лекарственная устойчивость, ** – широкая лекарственная устойчивость, в том числе устойчивость к колистину, *** – слабая биофленка, **** – умеренная биофленка, ***** – сильная биофленка, ***** – сиквенстип.

Note. * – extremely resistant, ** – extremely resistant, including resistance to colistin, *** – weak biofilm, **** – moderate biofilm, ***** – strong biofilm, ***** – sequenstype.

вили изолятов K1-серотипа, а к серотипу K2 принадлежало 10% изолятов. Стоит отметить, что 6 из 7 изолятов K2-серотипа имели генотип ST395. Эти данные согласуются с результатами отечественного исследования, в котором капсульный серотип K2 обнаруживался у 15,7% штаммов и ассоциировался с ST395 [14]. Ген *kfu*, отвечающий за обмен железа, встречается редко, у изученных нами изолятов — всего в 3%. Аналогичные данные получены российскими и зарубежными учеными [6, 21].

У нозокомиальных изолятов клебсиеллы чаще всего наблюдается продукция умеренных и сильных биопленок [2]. Наши результаты соответствуют этим данным — 61% изолятов образовывали умеренные биопленки и 21% — сильные.

Представители генотипа ST307, выделенные из кровотока, часто имеют множественную лекарственную устойчивость и гипервирулентность [15], они способны вызывать внутрибольничные вспышки [26]. ST307 в этом исследовании был самым распространенным (21%). Изоляты этого генотипа чаще остальных обладали карбапенемазами и факторами гипервирулентности. Этот генотип был характерен для обоих стационаров и в некоторых отделениях выявлялся на протяжении нескольких лет.

Факторами риска для возникновения *K. pneumoniae*-ассоциированных инфекций кровотока и ЦНС являются хирургические вмешательства, травмы, наличие внутрисосудистого катетера, интубация трахеи, госпитализация в отделение реанимации, предшествующая антибиотикотерапия [27]. В нашей работе большая часть пациентов наблюдалась с хирургической патологией (68%). У 14% пациентов до выявления бактериемии или инфекции ЦНС проводились курсы антибиотикотерапии и/или применялись глюкокортикостероиды.

В исследовании Girometti N. и соавт. отмечено, что инфекции кровотока связаны с более высокой смертностью, чем инфекции других локализаций [8]. Наши данные соотносятся с этим утверждением, уровень летальности по данным проведенного исследования составил 25%. Высокая смертность, возможно, ассоциирована с вирулентностью микроорганизмов [17]. В нашем исследовании у изолятов, выделенных при неблагоприятных исходах, определялось множество факторов вирулентности, в частности иерсиниебактин — 88%, аэробактин — 25% и капсульный серотип K2 — 13%.

Заключение

Наши результаты подтверждают, что бактериемии и инфекции ЦНС, ассоциированные с *K. pneumoniae*, относительно распространены у педиатрических пациентов, что представляет собой серьезную проблему для здравоохранения. Эти инфекции значительно осложняют течение основного заболевания и связаны с большим числом летальных исходов. Нерациональное применение антибиотиков способствует селективному распространению множественно-резистентных изолятов, которые к тому же приобретают факторы вирулентности. На основании этого клиницистам необходимо строго контролировать применение антимикробных препаратов, обеспечивая их рациональное использование.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование не имело финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов, который необходимо обнаружить.

Список литературы/References

- Новикова И.Е., Садеева З.З., Шакирзянова Р.А., Алябиева Н.М., Лазарева А.В., Карасева О.В., Вершинина М.Г., Фисенко А.П. Использование полимеразной цепной реакции для детекции генов резистентности у грамотрицательных бактерий в рутинной практике педиатрического стационара // Клиническая лабораторная диагностика. 2022. Т. 67, № 3. С. 180–185. [Novikova I.E., Sadeeva Z.Z., Shakirzyanova R.A., Alyabieva N.M., Lazareva A.V., Karaseva O.V., Verшинina M.G., Fisenko A.P. The using of the polymerase chain reaction for the detection of resistance genes in gram-negative bacteria in routine practice in a pediatric hospital. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 180–185. (In Russ.)] doi: 10.51620/0869-2084-2022-67-3-180-185
- Ahmed H.A., Ibrahim E.H.S., Abdelhaliem E., Elariny E.Y.T. Biotyping, virulotyping and biofilm formation ability of ESBL-Klebsiella pneumoniae isolates from nosocomial infections. *J. Appl. Microbiol.*, 2022, vol. 132, no. 6, pp. 4555–4568. doi: 10.1111/jam.15563
- Bachman M.A., Oyler J.E., Burns S.H., Caza M., Lépine F., Dozois C.M., Weiser J.N. Klebsiella pneumoniae yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. *Infect. Immun.*, 2011, vol. 79, no. 8, pp. 3309–3316. doi: 10.1128/IAI.05114-11
- Compain F., Babosan A., Brisse S., Genel N., Audo J., Ailloud F., Kassir-Chikhani N., Arlet G., Decré D. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of Klebsiella pneumoniae. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 12, pp. 4377–4380. doi: 10.1128/JCM.02316-14
- Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P.A., Brisse S. Multilocus sequence typing of Klebsiella pneumoniae nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 8, pp. 4178–4182. doi: 10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005

6. Fursova N.K., Astashkin E.I., Gabrielyan N.I., Novikova T.S., Fedyukina G.N., Kubanova M.K., Esenova N.M., Sharapchenko S.O., Volozhantsev N.V. Emergence of five genetic lines ST395^{NDM-1}, ST13^{OXA-48}, ST3346^{OXA-48}, ST39^{CTX-M-14}, and novel ST3551^{OXA-48} of multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* in Russia. *Microb. Drug Resist.*, 2020, vol. 26, no. 8, pp. 924–933. doi: 10.1089/mdr.2019.0289
7. German G.J., Gilmour M., Tipples G., Adam H.J., Almohri H., Bullard J., Dingle T., Farrell D., Girouard G., Haldane D., Hoang L., Levett P.N., Melano R., Minion J., Needle R., Patel S.N., Rennie R., Reyes R.C., Longtin J., Mulvey M.R. Canadian recommendations for laboratory interpretation of multiple or extensive drug resistance in clinical isolates of Enterobacteriaceae, Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa. *Can. Commun. Dis. Rep.*, 2018, vol. 44, no. 1, pp. 29–34. doi: 10.14745/ccdr.v44i01a07
8. Girometti N., Lewis R.E., Giannella M., Ambretti S., Bartoletti M., Tedeschi S., Tumietto F., Cristini F., Trapani F., Gaibani P., Viale P. *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: epidemiology and impact of inappropriate empirical therapy. *Medicine (Baltimore)*, 2014, vol. 93, no. 17, pp. 298–309. doi: 10.1097/MD.0000000000000111
9. Hernández-García M., Pérez-Viso B., León-Sampedro R., Navarro-San Francisco C., López-Fresneña N., Díaz-Agero C., Morosini M.I., Ruiz-Garbajosa P., Cantón R. Outbreak of NDM-1+CTX-M-15+DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* high-risk clone in Spain owing to an undetectable colonised patient from Pakistan. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2019, vol. 54, no. 2, pp. 233–239. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.05.021
10. Herridge W.P., Shibu P., O’Shea J., Brook T.C., Hoyles L. Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses. *J. Med. Microbiol.*, 2020, vol. 69, no. 2, pp. 176–194. doi: 10.1099/jmm.0.001141
11. Hu D., Li Y., Ren P., Tian D., Chen W., Fu P., Wang W., Li X., Jiang X. Molecular epidemiology of hypervirulent carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2021, vol. 11: 661218. doi: 10.3389/fcimb.2021.661218
12. Hu P., Chen J., Chen Y., Zhou T., Xu X., Pei X. Molecular epidemiology, resistance, and virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* cross-colonization clonal isolates in the non-outbreak setting. *Infect. Genet. Evol.*, 2017, vol. 55, pp. 288–296. doi: 10.1016/j.meegid.2017.09.010
13. Karlsson M., Stanton R.A., Ansari U., McAllister G., Chan M.Y., Sula E., Grass J.E., Duffy N., Anacker M.L., Witwer M.L., Rasheed J.K., Elkins C.A., Halpin A.L. Identification of a Carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Isolate in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2019, vol. 63, no. 7: e00519-19. doi: 10.1128/AAC.00519-19
14. Khrulnova S., Fedorova A., Frolova I., Tandilova K., Likold E., Klyasova G. Distribution of virulence genes and capsule types in *Klebsiella pneumoniae* among bloodstream isolates from patients with hematological malignancies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2022, vol. 104, no. 1: 115744. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2022
15. Kochan T.J., Nozick S.H., Medernach R.L., Cheung B.H., Gatesy S.W.M., Lebrun-Corbin M., Mitra S.D., Khalatyan N., Krapp F., Qi C., Ozer E.A., Hauser A.R. Genomic surveillance for multidrug-resistant or hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* among United States bloodstream isolates. *BMC Infect. Dis.*, 2022, vol. 22, no. 1: 603. doi: 10.1186/s12879-022-07558-1
16. Liu C., Du P., Xiao N., Ji F., Russo T.A., Guo J. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* is emerging as an increasingly prevalent *K. pneumoniae* pathotype responsible for nosocomial and healthcare-associated infections in Beijing, China. *Virulence*, 2020, vol. 11, no. 1, pp. 1215–1224. doi: 10.1080/21505594.2020.1809322
17. Lv J., Zhu J., Wang T., Xie X., Wang T., Zhu Z., Chen L., Zhong F., Du H. The role of the two-component QseBC signaling system in biofilm formation and virulence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ATCC43816. *Front. Microbiol.*, 2022, vol. 13: 817494. doi: 10.3389/fmicb.2022.817494
18. Mairi A., Pantel A., Ousalem F., Sotto A., Touati A., Lavigne J.P. OXA-48-producing Enterobacteriales in different ecological niches in Algeria: clonal expansion, plasmid characteristics and virulence traits. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2019, vol. 74, no. 7, pp. 1848–1855. doi: 10.1093/jac/dkz146
19. Marques A.T., Tanoeiro L., Duarte A., Gonçalves L., Vítor J.M.B., Vale F.F. Genomic analysis of prophages from *Klebsiella pneumoniae* clinical Isolates. *Microorganisms*, 2021, vol. 9, no. 11: 2252. doi: 10.3390/microorganisms9112252
20. Paczosa M.K., Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2016, vol. 80, no. 3, pp. 629–661. doi: 10.1128/MMBR.00078-15
21. Pan H., Lou Y., Zeng L., Wang L., Zhang J., Yu W., Qiu Y. Infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: microbiological characteristics and risk factors. *Microb. Drug Resist.*, 2019, vol. 25, no. 2, pp. 287–296. doi: 10.1089/mdr.2018.0339
22. Potron A., Poirel L., Rondinaud E., Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill.*, 2013, vol. 18, no. 31: 20549. doi: 10.2807/1560-7917.es2013.18.31.20549
23. Stepanović S., Vuković D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukić S., Cirković I., Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 2007, vol. 115, no. 8, pp. 891–899. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
24. Wyres K.L., Holt K.E. *Klebsiella pneumoniae* population genomics and antimicrobial-resistant clones. *Trends Microbiol.*, 2016, vol. 24, no. 12, pp. 944–956. doi: 10.1016/j.tim.2016.09.007
25. Xu M., Fu Y., Kong H., Chen X., Chen Y., Li L., Yang Q. Bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of bla_{KPC}, virulence factors and their impacts on clinical outcome. *BMC Infect. Dis.*, 2018, vol. 18, no. 1: 358. doi: 10.1186/s12879-018-3263-x
26. Yang Y., Yang Y., Chen G., Lin M., Chen Y., He R., Galvão K.N., El-Gawad El-Sayed Ahmed M.A., Roberts A.P., Wu Y., Zhong L.L., Liang X., Qin M., Ding X., Deng W., Huang S., Li H.Y., Dai M., Chen D.Q., Zhang L., Liao K., Xia Y., Tian G.B. Molecular characterization of carbapenem-resistant and virulent plasmids in *Klebsiella pneumoniae* from patients with bloodstream infections in China. *Emerg. Microbes. Infect.*, 2021, vol. 10, no. 1, pp. 700–709. doi: 10.1080/22221751.2021.1906163
27. Yuan Y., Wang J., Yao Z., Ma B., Li Y., Yan W., Wang S., Ma Q., Zhang J., Xu J., Li L., Wang Y., Fan E. Risk factors for Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections and outcomes. *Infect. Drug Resist.*, 2020, vol. 13, pp. 207–215. doi: 10.2147/IDR.S223243

28. Zhang S., Zhang X., Wu Q., Zheng X., Dong G., Fang R., Zhang Y., Cao J., Zhou T. Clinical, microbiological, and molecular epidemiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae*-induced pyogenic liver abscess in southeastern China. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 2019, vol. 8: 166. doi: 10.1186/s13756-019-0615-2
29. Zheng X., Wang J.F., Xu W.L., Xu J., Hu J. Clinical and molecular characteristics, risk factors and outcomes of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in the intensive care unit. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 2017, vol. 6: 102. doi: 10.1186/s13756-017-0256-2

Авторы:

Садеева З.З., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;

Новикова И.Е., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;

Лазарева А.В., д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, зав. лабораторией микробиологии ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;

Алябьева Н.М., к.м.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;

Карасева О.В., д.м.н., зав. отделом неотложной хирургии и травм детского возраста ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия; зам. директора по научной работе, руководитель отдела сочетанной травмы, анестезиологии-реанимации НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия;

Янюшкина О.Г., научный сотрудник отделения сочетанной травмы НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия;

Вершинина М.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории медицинской геномики ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;

Фисенко А.П., д.м.н., профессор, директор ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия.

Authors:

Sadeeva Z.Z., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Novikova I.E., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Lazareva A.V., DSc (Medicine), Head Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, Head of the Microbiology Laboratory, National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Alyabyeva N.M., PhD (Medicine), Senior Researcher, Head of the Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Karaseva O.V., DSc (Medicine), Head of the Department of Emergency Surgery and Pediatric Trauma, National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Deputy Director for Scientific Work, Head of the Department of Combined Trauma, Anesthesiology-Resuscitation, Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma, Department of Public Health of Moscow, Moscow, Russian Federation;

Yanushkina O.G., Researcher, Department of Combined Trauma, Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma, Department of Public Health of Moscow, Moscow, Russian Federation;

Vershinina M.G., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Medical Genomics, National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Fisenko A.P., DSc (Medicine), Professor, Director of the National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ СКРЫТОЙ ФОРМЫ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА В У ДОНОРОВ КРОВИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

Ю.В. Останкова¹, Е.Н. Серикова¹, Н.Ю. Ширшова², М.Б. Кусевичкая³, О.А. Горская⁴, В.В. Басина⁵, И.А. Машков⁶, Е.Б. Зуева¹, А.Н. Щемелев¹, Д.Э. Рейнгардт¹, В.С. Давыденко¹, Д.А. Муккель¹, А.А. Тотолян^{1,7}

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

² СПб ГБУЗ Городская поликлиника № 32, Санкт-Петербург, Россия

³ СПб ГУЗ Городская клиническая больница № 31, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБНУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

⁶ СПб ГБУЗ Городская поликлиника № 99, Санкт-Петербург, Россия

⁷ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью нашего исследования было оценить распространенность скрытой формы хронического гепатита В у доноров крови в Санкт-Петербурге, а также охарактеризовать выявленные изоляты вируса. В работе использованы 2800 образцов плазмы крови, полученные в 2019 г. от доноров крови, проживающих в Санкт-Петербурге. Методом ИФА определяли HBsAg, anti-HBs IgG, anti-HBcore IgG. ДНК ВГВ выявляли методом гнездовой ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» по трем мишеням, позволяющим определять ДНК вируса при низкой вирусной нагрузке, в том числе при HBsAg-негативном хроническом гепатите В. Серологические маркеры гепатита В выявили у 69,43% обследованных, HBsAg обнаружен у 0,43% лиц, причем все они сдавали кровь впервые. Показано достоверное превышение встречаемости антител анти-HBcore IgG среди первичных доноров (15,1%) по сравнению с повторными/регулярными (7,48%). Встречаемость ДНК вируса в группе составила 3,14%, в том числе 2,71% случаев, представляющих собой HBsAg-негативный ХГВ. На основании филогенетического анализа 88 изолятов определены субгенотипы ВГВ в следующих соотношениях: D1 и D2 — по 40,91%, D3 и A2 — по 9,09%. При определении серологического подтипа обнаруженных изолятов преобладал серотип ауw3 (52,27%) по сравнению с ауw2 (46,59%) и адw2 (10,23%). Мутации лекарственной устойчивости, включая компенсаторные, выявлены у шести обследованных (6,82%). Во всех изолятах генотипа D определены множественные аминокислотные замены в регионах RT, SHB, MNB, LNB, Core, мутации preCore региона выявлены у 21,59% образцов. В MHR области генома ВГВ генотипа D определены 26 позиций, в которых происходили аминокислотные замены, причем у всех изолятов показаны модификации в положениях 113, 114, 131, 134, 159, 161, 168, у 76 — в положении 122, у 68 — в положении 127, у 36 — в положении 118, у 24 — в положении 128. У изолятов ВГВ A2 определены мутации T113S, S143T, Y161F. В preCore регионе девяти изолятов выявлен полиморфизм, включающий стоп-кодон W28*W, в этой же позиции

Адрес для переписки:

Останкова Юлия Владимировна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 921 353-81-73. E-mail: shenna1@yandex.ru

Contacts:

Yuliia V. Ostankova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 921 353-81-73. E-mail: shenna1@yandex.ru

Для цитирования:

Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Ширшова Н.Ю., Кусевичкая М.Б., Горская О.А., Басина В.В., Машков И.А., Зуева Е.Б., Щемелев А.Н., Рейнгардт Д.Э., Давыденко В.С., Муккель Д.А., Тотолян А.А. Распространенность скрытой формы хронического гепатита В у доноров крови в Санкт-Петербурге // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1129–1140. doi: 10.15789/2220-7619-POO-14480

Citation:

Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Shirshova N.Yu., Kusevitskaya M.B., Gorskaya O.A., Basina V.V., Mashkov I.A., Zueva E.B., Shchemelev A.N., Reingardt D.E., Davydenko V.S., Mukkel D.A., Totolian A.A. Prevalence of occult hepatitis B infection among blood donors in Saint Petersburg // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1129–1140. doi: 10.15789/2220-7619-POO-14480

Отраслевая НИР «Парентеральные вирусные гепатиты: скрытая форма хронических гепатитов В и С при моно- и коинфекции в популяции и в группах риска, а также в зависимости от генетического полиморфизма генов хозяина» № AAAA-A21-121021600219-5.

Industry research work "Parenteral viral hepatitis: a latent form of chronic hepatitis B and C with mono- and co-infection in the population and in risk groups, as well as depending on the genetic polymorphism of host genes" No. AAAA-A21-121021600219-5.

© Останкова Ю.В. и соавт., 2023

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-POO-14480>

у пяти изолятов показана замена W28S, у еще одного образца определен вариант W28*S. Высокая частота встречаемости HBsAg-негативных случаев ХГВ среди доноров крови, а также преобладание изолятов ВГВ, несущих одновременно мутации, приводящие к диагностической неудаче тестов на HBsAg и профилактической неэффективности иммуноглобулина или вакцин и реактивации вируса, а также мутации, способствующие прогрессированию заболевания, очевидно несет угрозу здравоохранению и нуждается в дальнейшем изучении.

Ключевые слова: вирус гепатита В, скрытый гепатит В, серологические маркеры, молекулярно-биологические маркеры, варибельность ВГВ, генотипы, клинически значимые мутации, безопасность крови, лабораторная диагностика.

PREVALENCE OF OCCULT HEPATITIS B INFECTION AMONG BLOOD DONORS IN SAINT PETERSBURG

Ostankova Yu.V.^a, Serikova E.N.^a, Shirshova N.Yu.^b, Kusevitskaya M.B.^c, Gorskaya O.A.^d, Basina V.V.^e, Mashkov I.A.^f, Zueva E.B.^a, Shchemelev A.N.^a, Reingardt D.E.^a, Davydenko V.S.^a, Mukkel D.A.^a, Totolian A.A.^{a,g}

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

^b City Polyclinic No. 32, St. Petersburg, Russian Federation

^c City Clinical Hospital No. 31, St. Petersburg, Russian Federation

^d D.O. Ott Research Institute of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, St. Petersburg, Russian Federation

^e St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^f City Polyclinic No. 99, St. Petersburg, Russian Federation

^g I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to assess the prevalence of occult hepatitis B infection among blood donors in St. Petersburg, as well as to characterize the identified virus isolates. The study material was represented by 2800 blood plasma samples collected in 2019 from blood donors living in St. Petersburg. The ELISA study for HBV marker rate consisted of HBsAg, anti-HBs IgG, anti-HBcore IgG. HBV DNA was analyzed by nested PCR with real-time hybridization-fluorescence detection on three targets allowing to determine virus DNA at low viral load, including HBsAg-negative chronic hepatitis B. Hepatitis B serological markers were detected in 69.43% of those surveyed, HBsAg was found in 0.43% of individuals, and all of which donated blood first time. A significant excess of the anti-HBcore IgG antibodies occurrence among primary donors (15.1%) compared with repeated/regular donors (7.48%) was shown. The prevalence of virus DNA in the group was 3.14%, including 2.71% of cases in HBsAg-negative CHB. Based on phylogenetic analysis of 88 isolates, HBV subgenotypes were determined in the following order: D1 and D2, 40.91% each, D3 and A2, 9.09% each. While determining the serological subtype in detected isolates, the serotype ayw3 (52.27%) vs ayw2 (46.59%) and adw2 (10.23%) prevailed. Drug resistance mutations, including compensatory ones, were detected in six examined patients (6.82%). In all genotype D isolates, multiple amino acid substitutions were identified in the RT, SHB, MHB, LHB, and Core regions; mutations in the preCore region were detected in 21.59% samples. In the MHR of the HBV genotype D genome, twenty-six positions were identified in which amino acid substitutions occurred, and all isolates showed modifications at positions 113, 114, 131, 134, 159, 161, 168, in 76 — at position 122, in 68 — at position 127, in 36 — at position 118, in 24 — at position 128. In HBV A2 isolates, mutations T113S, S143T, Y161F were identified. Nine isolates in the preCore region showed a polymorphism including a stop codon W28*W; in five isolates the W28S substitution was shown in the same position, and the W28*S variant was found in one more sample. The high incidence of HBsAg-negative CHB cases among blood donors, as well as the predominance of HBV isolates that simultaneously carry mutations resulting in diagnostic failure of HBsAg tests and prophylactic failure of immunoglobulin or vaccines and virus reactivation, mutations that contribute to disease progression obviously pose a threat to health and require to be further examined.

Key words: hepatitis B virus, occult hepatitis B, serological markers, molecular biological markers, HBV variability, genotypes, clinically significant mutations, blood safety, laboratory diagnostics.

Введение

Вирусный гепатит В (ГВ) представляет собой серьезное инфекционное заболевание печени, вызываемое вирусом гепатита В (ВГВ), передающимся при контакте слизистых оболочек с зараженной кровью или другими жидкостями организма [45]. Частота развития хронического вирусного гепатита В (ХГВ) обратно пропорциональна возрасту больных: хронизация при инфицировании в возрасте до 5 лет превышает 90%, в то время как у взрослых только 5% инфекции приводят к ХГВ. У 20–30% больных ХГВ развивается цирроз и рак печени. К настоящему времени в мире около 2 млрд человек заражены ВГВ

и, по разным данным, от 290 до 360 млн из них больны ХГВ, причем только около 30,4 млн знают о своем заболевании [46]. Несмотря на десятилетия изучения, внедрение эффективных вакцин и терапию, обеспечивающую контроль репликации вируса, современные противовирусные препараты не способны привести к полной элиминации ВГВ у пациентов с хроническим заболеванием [29]. Связано это с особенностями жизненного цикла патогена, включающего длительное сохранение кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК) вируса в ядрах гепатоцитов и ее способностью становиться матрицей для субгеномных и прегеномных РНК. Используя РНК-полимеразу II хозяина, ккзДНК

транскрибирует несколько мРНК с перекрывающимся 3'-концом: пресоге и прегеномную РНК протяженностью около 3500 нуклеотидов (нт), поверхностную мРНК 2400/2100 нт и Х-мРНК размером 700 нт. Посредством обратной транскрипции прегеномной РНК, катализируемой вирусной полимеразой, реплицируется ДНК ВГВ в цитоплазматическом нуклеокапсиде [40]. В результате этого явления одной из естественных форм течения ХГВ является скрытый ГВ (скГВ), при котором в периферической крови больного не обнаруживают HBsAg, однако вирус сохраняется в виде ккзДНК в гепатоцитах, в связи с чем ДНК ВГВ выявляют в тканях печени и/или в крови. Однако выявление ДНК вируса в плазме крови затруднено из-за крайне низкой вирусной нагрузки и ограниченной чувствительности большинства используемых в рутинной лабораторной практике диагностических наборов [36]. В связи с тем, что при скГВ уровень HBsAg в плазме крови больного незначителен, а вирусная нагрузка не превышает 200 МЕ/мл, в большинстве случаев составляя 25 МЕ/мл и менее, выявляемая разными исследовательскими командами распространенность данной формы заболевания варьирует и зависит от встречаемости ВГВ в изучаемой популяции в целом, программы вакцинации против ГВ, особенностей обследуемых групп, факторов риска, чувствительности используемых методов. Кроме того, однократное тестирование может привести к ложнонегативному результату анализа, в то время как многократное тестирование образцов в динамике оптимально для достоверного определения патогена [37]. Так, нижний предел обнаружения многих коммерческих диагностических тестов на HBsAg составляет 0,05 МЕ/мл. Было показано, что среди негативных образцов, протестированных с помощью таких наборов, до 48% случаев оказываются позитивными при использовании тест-систем с пределом обнаружения 0,005 МЕ/мл [35].

Клиническая значимость скГВ остается дискуссионным вопросом, так как, с одной стороны, низкая, не определяемая рутинными диагностическими наборами, вирусная нагрузка и отсутствие HBsAg в крови больного — именно тот результат, к которому стремятся при лечении ХГВ. С другой стороны, скГВ является фактором риска ускоренного прогрессирования заболевания печени, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы при хроническом вирусном гепатите С (ХГС) и других заболеваниях печени различного генеза [24, 26, 44]. Показан также повышенный риск развития ГЦК у больных скГВ без иных сопутствующих заболеваний печени [41]. Кроме того, при HBsAg-негативном ХГВ есть вероятность реактивации вируса при иммуносупрессии. Так, реактивация была показана

почти у 40% пациентов, получающих иммуносупрессивную терапию и/или химиотерапию при онкологии и иных заболеваниях [22, 38, 39].

В связи с вышесказанным, особого внимания заслуживают доноры крови, так как переливание крови и ее продуктов представляет собой значимую часть терапии при тяжелых состояниях различного генеза, а донор со скрытым ХГВ может стать источником инфицирования реципиентов [11, 19]. Поскольку инфицирующая доза составляет приблизительно 3,5 МЕ/мл, для выявления ДНК вируса у доноров крови необходимо использовать высокоспецифичные и чувствительные ПЦР-наборы (нижний предел обнаружения 2–5 МЕ/мл), а также не использовать при диагностике минипулы, значительно снижающие чувствительность анализа [20]. Однако стандартизированных методов, обеспеченных программой внешнего контроля качества, в настоящее время не существует, а общие рекомендации подразумевают использование вариаций ПЦР (nested-ПЦР, капельная цифровая ПЦР), направленных на амплификацию, как минимум, двух различных геномных областей ВГВ. Важно при этом, чтобы анализ был одинаково эффективен для различных генотипов и субгенотипов вируса [10, 21, 36]. Гиподиагностика ВГВ в группах риска и группах, потенциально связанных с распространением вируса (в первую очередь — доноры крови), остается серьезным препятствием на пути ликвидации вирусного гепатита В как угрозы общественному здравоохранению [45]. Чрезвычайно важно определять встречаемость скГВ в регионах мира среди здоровых доноров крови для оценки вероятности передачи ВГВ посредством переливания крови и необходимости модификации стратегий отбора доноров для снижения риска. Последующее генотипирование обнаруженных изолятов и выявление клинически значимых мутаций могут служить важным эпидемиологическим инструментом для изучения путей распространения вируса, а также его географической эволюции.

Целью нашей работы было оценить распространенность скрытой формы хронического гепатита В у доноров крови в Санкт-Петербурге, а также охарактеризовать выявленные изоляты вируса.

Материалы и методы

В работе были использованы 2800 образцов плазмы крови, полученные в 2019 г. от доноров крови, проживающих в Санкт-Петербурге. Все обследованные дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. На проведение данного исследования было получено согласие локального Этического комитета ФБУН НИИЭМ имени Пастера.

В рамках исследования определяли следующие серологические и молекулярно-биологические

кие маркеры ХГВ: HBsAg, антитела анти-HBs IgG, анти-HBcore IgG, ДНК ВГВ. Тестирование проводили в двух повторах с применением коммерческих наборов «ДС-ИФА-HBsAg», «ДС-ИФА-АНТИ-HBsAg», «ДС-ИФА-АНТИ-HBc» (НПО «Диагностические Системы», Россия) и «Вектогеп В-HBs-антиген», «ВектоHBsAg-антитела», «ГепаБест анти-HBc-IgG» (АО «Вектор-Бест», Россия), согласно инструкциям производителя.

Экстракцию нуклеиновых кислот осуществляли с использованием коммерческого набора «АмплиПрайм Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Предварительно для всех образцов проводили концентрирование вирусных частиц ультрацентрифугированием плазмы крови в течение 1 ч при 24 000g, +4°C.

Выявление ВГВ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» проводили двумя способами: с использованием коммерческого диагностического набора реагентов «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия), согласно инструкции производителя, а также с применением разработанной в ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» технологии выявления в биологическом материале ДНК патогена при низкой вирусной нагрузке на основе гнездовой ПЦР с детекцией по трем мишеням, позволяющей выявлять ДНК ВГВ, в том числе при HBsAg-негативном ХГВ [5]. Прямое секвенирование нуклеотидных последовательностей полных геномов выявленных изолятов ВГВ и филогенетический анализ проводили как описано ранее [2].

Статистическую обработку данных производили с помощью пакета программ MS Excel, Prizm 5.0 (GraphPad Software Inc.). При оценке статистической погрешности использовали «точный» интервал Клоппера–Пирсона. Результаты представлены с указанием 95% доверительного интервала (95% ДИ). Для оценки достоверности различий численных данных,

полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса. В качестве порога достоверности отличий было определено значение вероятности $p < 0,05$.

Результаты

Оценка половозрастной структуры показала превалирование мужчин (71,71%) в обследуемой группе. Возраст варьировал от 18 до 64 лет, при ранжировании доноры в возрасте 18–20 лет составили 3,14% (95% ДИ: 2,53–3,86%) общей группы, в возрасте 21–30 лет — 35,57% (95% ДИ: 33,8–37,38%), 31–40 лет — 32,57% (95% ДИ: 30,84–34,34%), 41–50 лет — 22,57% (95% ДИ: 21,03–24,17%), 51–64 года — 6,14% (95% ДИ: 5,28–7,1%). В обследованной группе первичные доноры составляли 768 человек, то есть 27,43% случаев.

Серологические маркеры ГВ выявили у 69,43% (95% ДИ: 67,68–71,13%) обследованных лиц (табл.).

У 12 первичных доноров выявлен HBsAg, что составило 0,43% от общей группы, 1,56% (95% ДИ: 0,81–2,71%) от подгруппы первичных доноров, 0,62% от всех серопозитивных лиц. Показано достоверное превышение встречаемости антител анти-HBcore IgG среди первичных доноров (15,1%; 95% ДИ: 12,64–17,84%) по сравнению с повторными/регулярными (7,48%; 95% ДИ: 6,37–8,71%) — $\chi^2 = 37,428$ при $p < 0,0001$, число степеней свободы (degrees of freedom — df) = 1. Среди обследуемых доноров крови серопозитивные мужчины превалировали в общей группе (48,14%; 95% ДИ: 46,28–50,01%) по сравнению с женщинами (21,29%; 95% ДИ: 19,78–22,85%), как и в группе серопозитивных людей, где мужчины представлены в 69,34% (95% ДИ: 67,24–71,39%) случаев. При этом встречаемость маркеров ГВ у женщин (75,25%; 95% ДИ: 72,09–78,22%)

Таблица. Распределение серологических маркеров гепатита В (HBsAg, анти-HBc IgG, анти-HBs IgG) в обследованной группе и среди серопозитивных лиц

Table. Distribution of the hepatitis B serological markers (HBsAg, anti-HBc IgG, anti-HBs IgG) in the examined group and among seropositive individuals

Выявленные серологические маркеры в сыворотке крови Revealed blood serum serological markers	Доноры крови (n = 2800), доля от общего числа обследованных лиц Blood donors (n = 2800), percentage out of total number of individuals	Серопозитивные доноры крови (n = 1944), доля от числа лиц с серологическими маркерами гепатита В Seropositive blood donors (n = 1944), percentage of number of individuals with hepatitis B serological markers
HBsAg	12 (0,43%; 95% ДИ: 0,22–0,75%)	0,62%, (95% ДИ: 0,32–1,08%)
HBs IgG	1616 (57,71%; 95% ДИ: 55,86–59,55%)	83,13%, (95% ДИ: 81,39–84,77%)
HBc IgG	268 (9,57%; 95% ДИ: 8,51–10,72%)	13,79% (95% ДИ: 12,28–15,4%)
HBc IgG + HBs IgG	48 (1,71%; 95% ДИ: 1,27–2,27%)	2,47% (95% ДИ: 1,83–3,26%)
Серонегативные лица Seronegative individuals	856 (30,57%; 95% ДИ: 28,87–32,32%)	–

достоверно выше, чем у мужчин (67,13%; 95% ДИ: 65,03–69,18%) — $\chi^2 = 17,648$ при $p < 0,0001$, $df = 1$, как и встречаемость антител анти-НВs IgG: 69,7% (95% ДИ: 66,36–72,88%) у женщин и 52,99% (95% ДИ: 50,78–55,19%) — $\chi^2 = 64,976$ при $p < 0,0001$, $df = 1$. Напротив, распространенность антител анти-НВscore IgG выше среди доноров-мужчин (11,16%; 95% ДИ: 9,81–12,61%) по сравнению с женщинами (5,56%; 95% ДИ: 4,07–7,39%) — $\chi^2 = 20,578$ при $p < 0,0001$, $df = 1$.

Методом гнездовой ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» по трем вирусным мишеням ДНК ВГВ зарегистрировали у всех НВsAg-положительных, а также у 76 НВsAg-негативных (2,71%; 95% ДИ: 2,14–3,39%) человек. Встречаемость ДНК вируса среди доноров крови составила 3,14% (95% ДИ: 2,53–3,86%). Наибольшая часть изолятов ВГВ была получена от мужчин — 90,91% (95% ДИ: 82,87–95,99%), распространенность ДНК вируса среди мужчин (3,98%; 95% ДИ: 3,17–4,94%) достоверно превышала таковую у женщин (1,01%; 95% ДИ: 0,44–1,98%) — $\chi^2 = 16,502$ при $p < 0,0001$, $df = 1$. В группе ДНК ВГВ-положительных доноров преобладали люди в возрасте 31–40 лет (45,45%; 95% ДИ: 34,8–56,42%), затем 41–50 лет (27,27%; 95% ДИ: 18,32–37,81%), 21–30 лет (18,18%; 95% ДИ: 10,76–27,84%), 51–64 лет (9,09%; 95% ДИ: 4,01–17,13%), у доноров в возрасте 20 лет и младше ДНК вируса не выявили. При анализе серологических и молекулярно-биологических маркеров только у 23,88% (95% ДИ: 18,9–29,45%) НВsAg-негативных доноров с изолированными антителами анти-НВscore IgG определили ДНК ВГВ. Напротив, 84,21% (95% ДИ: 74,04–91,57%) случаев скГВ серопозитивны по анти-НВscore IgG.

На основании филогенетического анализа 88 изолятов показано, что в обследованной группе преобладал ВГВ генотипа D (90,91%; 95% ДИ: 82,87–95,99%), в восьми случаях выявлен генотип A (9,09%; 95% ДИ: 4,01–17,13%). При этом среди пациентов с ВГВ генотипа D в равных долях были представлены субгенотипы D1 и D2 — по 45% каждый, D3 — 10%. Таким образом, у доноров крови представлены субгенотипы ВГВ в следующих соотношениях: D1 и D2 — по 40,91% (95% ДИ: 30,54–51,91%), D3 и A2 — по 9,09% (95% ДИ: 4,01–17,13%) (рис.).

На основе анализа нуклеотидной последовательности консервативной области детерминанты «а» НВsAg определены серотипы вирусов, характеризующие их антигенную специфичность. При определении серологического подтипа обнаруженных изолятов преобладал серотип ауw3 (52,27%; 95% ДИ: 41,35–63,04%), в несколько меньшем количестве представлен серотип ауw2 (46,59%; 95% ДИ: 35,88–57,54%) и в значительно меньшем — адw2 (10,23%; 95% ДИ: 4,78–18,53%). При этом для ВГВ генотипа A и субгенотипа D2

определены только серотипы адw2 и ауw3 соответственно, в то время как среди изолятов субгенотипа D3 обнаружены серотипы ауw2 и, в меньшей степени, ауw3. Интересно отметить, что, хотя большинство ВГВ субгенотипа D1 характеризовались серотипом ауw2, один изолят принадлежал к серотипу адw2.

У НВsAg-негативных и позитивных изолятов генотипа D определены множественные аминокислотные замены в регионах RT, SHB, MNB, LNB, Core. Мутации preCore региона выявлены у 21,59% (95% ДИ: 13,53–31,65%) образцов. В то же время у одного из изолятов ВГВ A2 в указанных областях выявлено не более трех естественных замен, а у другого — представлены клинически значимые мутации, связанные с устойчивостью к лекарственным препаратам. Полиморфизм preCore области у ВГВ A2 не показан.

Мутации лекарственной устойчивости L180M и M204V (резистентность к ламивудину, телбивудину, частичная резистентность к энтекавиру) выявлены у двух изолятов субгенотипа A2 и одного субгенотипа D2, еще для одного изолята D2 определена мутация M204I. Кроме того, все изоляты A2 имели замену L217R в S-регионе. У двух изолятов субгенотипа D1 обнаружена компенсаторная мутация S202G. Мутация M129L определена в двенадцати случаях.

В регионе главной гидрофильной области (Major Hydrophilic Region — MHR) ВГВ генотипа D определены 26 позиций, в которых происходили аминокислотные замены: C107G, I110S/L, P111Q, T113S, T114A/S, T118A/V, K122R, T125M, T127P, A128V, Q129R, G130A, N131T, F134Y, C138W, C139G, S143P/L, G145E, P151H/R/S, A157G/P, A159G, Y161F, W163*W, E164K, W165*W, V168A. Причем у всех изолятов показаны модификации в положениях 113, 114, 131, 134, 159, 161, 168, у 76 — в положении 122, у 68 — в положении 127, у 36 — в положении 118, у 24 — в положении 128. У изолятов ВГВ A2 определены мутации T113S, S143T, Y161F.

В preCore регионе девяти изолятов выявлен полиморфизм, включающий стоп-кодон W28*W, в этой же позиции у пяти изолятов показана замена триптофана на серин, у еще одного образца определен вариант W28*S. У девяти изолятов определены мутации G29D.

Непосредственно в регионе Core генотипа D определены следующие позиции, в которых происходили аминокислотные замены: T12S, S21T/H/A/Q, F24Y, V27L, D29Q, A34T, E40D/Q, A41P, P45H, S49T, L55I, E64D, M66L/R, T67N/S, A69V/S, N74G/V, E77D, D78H, P79Q, A80I/T, D83E, N87S, V89D, N90H, T91N, N92H, M93V, L95I, I97F/L, I105V, T109S, F110L, E113Q/D, L116V/I, Y118D, W125, I126, P130A, A131T, P135S, N136D, T142L, L143R, T147C, V149I, R151P, D153*, R154*, S157T, Q179K, S183P. У изолятов ВГВ A2 определены мутации P50H, I59V, I105L, T109M, R151C, Q179K.

Обсуждение

Полученные нами данные о значительном преобладании кадровых доноров по сравнению с первичными не противоречат данным показателей деятельности службы крови Российской Федерации, согласно которым в 2019 г. общее число доноров крови и/или ее компонентов в стране составило 1 278 520 человек, в том числе 343 555 первичных доноров [8]. Выявленная нами более высокая встречаемость серологических маркеров ГВ у женщин по сравнению с мужчинами, несмотря на общее преобладание мужчин как в группе доноров в целом, так и среди серопозитивных лиц, обусловлена антителами анти-HBs IgG (69,7% у женщин, 52,99% у мужчин), являющимися, вероятно, по большей части следствием вакцина-

ции против ВГВ. Связано это, по всей видимости, с более ответственным подходом женщин к своему здоровью и к донорству крови. Напротив, преобладание антител анти-HBscore IgG в группе мужчин по сравнению с женщинами косвенно подтверждает это предположение. Встречаемость анти-HBscore IgG в нашей группе (9,57%) сопоставима с данными по Санкт-Петербургу в 2019 г. Варибельность распространенности маркера в разных группах доноров крови зависит от многих факторов и показана в других регионах мира. Так, например, среди доноров в Иране распространенность анти-HBc IgG составляет от 2,1 до 11,5% [27]. Сочетание анти-HBscore IgG с анти-HBs IgG характерно для ранее инфицированных и выздоровевших людей с естественной иммунизацией, но также может указывать на контакт обследуемого



Рисунок. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов ВГВ, выделенных от доноров крови, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями

Figure. Phylogenetic analysis of complete HBV genome nucleotide sequences isolated from blood donors compared with the reference sequences presented in the GenBank international database

Примечание. Референсные последовательности обозначены кодами GenBank с указанием генотипа и региона происхождения образца. В качестве внешней группы использована нуклеотидная последовательность ВГВ шерстистый обезьяны AY226578. Исследованные в настоящей работе образцы обозначены белыми ромбами (HBsAg+) и черными ромбами (HBsAg-). Даны значения bootstrap ≥ 70 .

Note. Reference sequences are designated with GenBank codes indicating the genotype and geographic region of the sample origin. The Woolly Monkey HBV nucleotide sequence AY226578 was used as the outer group. The samples studied here are marked by white (HBsAg+) and black diamonds (HBsAg-), respectively. Bootstrap values ≥ 70 .

с вирусом после вакцинации. Представленность данного серологического профиля в нашем исследовании сопоставима с его распространенностью у доноров крови в Саудовской Аравии (6,3%) [13] и практически в 2 раза ниже, чем в Марокко (14,12%) [23].

В настоящей работе HBsAg выявлен у 12 первичных доноров, то есть 0,43% от общей группы, что несколько выше количества отводов от донорства в связи с обнаружением данного маркера в 2019 г. (0,14%) [8], но отличия могут быть связаны с объемом выборок. В то же время в РФ в 2019 г. выявление HBsAg стало причиной 1,41% брака от всех случаев брака консервированной крови, 1,86% от всех случаев брака клеток крови и 1,8% от всех случаев брака плазмы, в то время как брак по причине повышенной активности АЛТ составил 22,2, 50,92 и 42,34% соответственно. Число доноров, отведенных от донорства в связи с обнаружением HBsAg, составило 0,14%, практически в 2 раза ниже, чем отведенных в связи с выявлением антител к вирусу гепатита С (ВГС) — 0,31% [8]. Минимальные доли первичных и повторных доноров, у которых выявлены маркеры ВГВ, были зафиксированы в Северо-Западном федеральном округе. Частота отводов первичных доноров по этой причине составила 0,11%, повторных — 0,01%, тогда как отводов в связи с выявлением антител анти-ВГС — 0,45 и 0,06% соответственно [9]. Сходное соотношение показано в отделении переливания крови ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», где отвод доноров в 2019 г. в связи с выявлением HBsAg составил 0,02%, а в связи с выявлением анти-ВГС — 0,12% [6]. Однако, как известно, антитела к ВГС определяют приблизительно у 110 млн человек, а обладающий репликативной активностью вирус — у 80 млн из них [16], то есть как инфицированных ВГС, так и хронически больных гепатитом С людей значительно меньше, чем инфицированных ВГВ и больных ХГВ. Заболеваемость же вирусными гепатитами в РФ достаточно высока в целом, но интенсивность эпидемического процесса гепатита С ниже, чем гепатита В [3]. Таким образом, большее количество отводов от донорства из-за выявленных маркеров ВГС, чем из-за маркеров ВГВ, поднимает вопрос: были ли обнаружены все случаи ГВ, достаточно ли было применяемых скрининговых методов? Выявленная нами ДНК ВГВ у HBsAg-негативных доноров крови очевидно отвечает на этот вопрос отрицательно.

Среди HBsAg-негативных доноров крови ($n = 2788$) ДНК ВГВ выявлена у 76 человек, то есть в 2,85% случаев. Данное обстоятельство указывает на необходимость внедрения в рутинную диагностику молекулярно-генетических методов высокой чувствительности, позволяющих иден-

тифицировать вирус при низкой нагрузке. В соответствии с Таорминским консенсусом, для достоверного выявления патогена использовали ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням [5, 36].

Скрытый ГВ подразделяют на серонегативный, то есть без выявляемого уровня серологических маркеров в плазме крови, и серопозитивный, сопровождающийся антителами против HBsAg и/или против HBcAg [36]. Большинство выявленных нами случаев представлено серопозитивным по анти-HBcore IgG скГВ (84,21%). Поскольку механизм развития серопозитивного скГВ связан с потерей HBsAg как после разрешения острого гепатита В, так и после длительного HBsAg-позитивного ХГВ, больные серонегативным скГВ могут быть таковыми с момента инфицирования, но могут и постепенно терять антитела, а при бессимптомном течении обследуемые, вероятно, не знали о своем диагнозе, то есть определить по какому пути шло развитие заболевания не представляется возможным. Хотя, согласно литературным данным, скГВ не менее чем в 80% случаев является серопозитивным, что согласуется с полученными результатами, в некоторых группах и регионах распространенность серонегативного скГВ превышает 20%. Так, ранее нами было показано преобладание серонегативной формы скГВ среди доноров крови в Казахстане (87,3%) [34]. Не исключено, что высокая частота встречаемости серонегативного скГВ в Казахстане связана с эндемичностью региона по вирусным гепатитам, однако в Гвинейской Республике, где распространенность ВГВ крайне высока, среди значительного количества доноров крови с скГВ только 17,95% случаев были серонегативны [1]. Причины, по которым в тех или иных группах населения разных стран преобладает серонегативный скГВ, еще предстоит выяснить.

Отдельного внимания заслуживает распределение геновариантов ВГВ в обследуемой группе. Несмотря на десятилетия, посвященные изучению вируса, взаимосвязь между генотипами ВГВ и клиническим профилем заболевания остается не до конца раскрытой из-за сложного взаимодействия между вирусом, хозяином и факторами окружающей среды. В целом, наиболее распространенные в России генотипы D и A чаще приводят к хронизации, причем генотип A ассоциирован с лучшим ответом на терапию интерфероном, в то время как генотип D плохо поддается такому лечению, что усугубляется свойственным генотипу большим количеством мутаций [28, 43]. Преобладание генотипа D и наличие некоторой доли генотипа A типично для России в целом и для СЗФО в частности [42]. Однако в то время как в качестве доминантного, достигающего в регионе распространенности 80% и выше, описан субгенотип D2, среди исследованных в настоящей работе изо-

лятов в равных пропорциях представлены субгенотипы ВГВ D1 и D2 — по 40,91%. Ранее мы описывали генотипические профили ВГВ некоторых групп на территории СЗФО. Так, у военнослужащих с ХГВ анализ субгенотипов демонстрировал некоторое повышение встречаемости субгенотипов D1 и D3, но в целом распределение было со значимым преобладанием D2: D2 — 58%, D1 — 20,9%, D3 — 16,3%, A2 — 4,8% [4]. У лиц с впервые выявленным ВИЧ и коинфекцией ВГВ, включая скрытую форму заболевания, распространение геновариантов сходное: D2 — 55,6%, D1 — 22,2%, D3 — 13,9%, A2 — 8,3% [7]. Тем не менее при сравнительном анализе не выявлено достоверных различий в распределении геновариантов в группе доноров крови и в группах больных ХГВ и ВИЧ/ВГВ. Таким образом, показанное нами относительно повышенное количество ВГВ D1 и пониженное D2 может быть связано как с ограниченным объемом выборки, увеличение которой приведет к выявлению свойственного для региона распределения геновариантов, так и с истинным ростом встречаемости ВГВ D1 в Санкт-Петербурге за счет постоянного притока ВГВ-инфицированных мигрантов из стран Средней Азии. Понимание истинного распределения генетических вариантов вируса имеет большое значение, так как, несмотря на постепенные изменения генотипических профилей ВГВ в разных географических регионах, способствующие появлению и циркуляции все новых вариантов, распространение генотипов/субгенотипов все же ограничено, а характеристика их в популяции способствует эпидемиологическому анализу, отслеживанию моделей передачи ВГВ и объема введения импортированных штаммов [33].

Антигенная специфичность ВГВ определяется третичной структурой детерминанты «а», входящей в главный гидрофильный регион (МНР) генома вируса, на основе которой выделяют девять основных серотипов: ауw1, ауw2, ауw3, ауw4, ауg, адw2, адw4, адwq, адr, адr_q. В целом между серотипами и генотипами показана статистически достоверная связь: адw связан с генотипами А, В, F, G, H, адr — с С, ауw — с D и E, однако возможны и исключения [47]. В нашей работе при определении серологического подтипа в группе доноров крови преобладал серотип ауw3 по сравнению с ауw2 и адw2. Не выявлено различия между HBsAg-положительными и отрицательными случаями ГВ относительно распределения серотипов. Изолят HBV_OBI_SPb132 субгенотипа D1 обладал нехарактерной для генотипа D последовательностью в регионе детерминанты «а» — ААААААССТGGAACC — и, соответственно, серотипом адw2. Уникальной такая находка не является, но, несомненно, заслуживает внимания, так как может представлять собой завозной случай.

Показанная нами изменчивость регионов генома ВГВ генотипа D согласуется с данными о высокой естественной вариабельности генома данного геноварианта, ассоциированной с хронизацией и прогрессированием заболевания, а также с низким ответом на терапию на основе интерферона [43]. Выявление компенсаторного полиморфизма S202G свидетельствует о потенциальной возможности распространения варианта вируса, развитие в котором мутаций устойчивости к энтекавиру будет сопровождаться высокой репликативной активностью патогена. В связи с этим необходимо с вниманием относиться к обнаружению компенсаторных мутаций даже при отсутствии фармакорезистентных замен. Интересно отметить, что, помимо обнаружения мутаций устойчивости, все изоляты A2 имели замену L217R в S-регионе. От 8 до 15% пациентов, начинающих лечение адефовиrom, изначально не реагируют на терапию; ряд исследователей сообщали о связи естественного полиморфизма L217R, характерного для генотипа A2, с пониженной чувствительностью к адефовиру [17]. Дополнительно мы отметили 12 случаев выявления в регионе обратной транскриптазы мутации M129L, которая, по мнению некоторых авторов, может оказаться связанной с устойчивостью к тенофовиру [15, 31].

Отметим среди изолятов скГВ случаи выявления стоп-кодона W28* и замены W28S в preCore регионе. Несмотря на то что пури-пуриновые точечные замены более часты, чем пури-пиримидиновые, не исключено, что замена UGG (триптофан) на UCG (серин) представляет собой шаг в переходе к UAG, то есть к стоп-кодону, являющемуся следствием мутации G1896A, приводящей к усечению предшественника HBeAg и отмене экспрессии антигена. Как известно, этот полиморфизм характерен для изолятов от HBeAg-отрицательных больных, инфицированных вирусом генотипа D [28]. Косвенным подтверждением такого предположения является обнаружение образца с вариантом замены W28*S.

Для большинства выявленных в регионе Core аминокислотных замен достоверных сведений об их клинической значимости не существует. Однако известны сайты иммунного распознавания HBcAg, в том числе эпитопы-мишени для CD4⁺ Т-клеток человека (аминокислотные позиции 1–20, 50–69, 81–105, 117–131, 141–165), цитотоксических Т-лимфоцитов/CD8⁺ Т-клеток (аминокислотные позиции 18–27, 88–96, 130–140, 141–151), эпитопы В-клеток (аминокислотные позиции 74–89, 107–118, 127–138). Мутации в таких иммуноактивных участках HBcAg имеют жизненно важное значение для персистенции вируса, иммунного ответа хозяина и прогрессирования заболевания [12]. Таким образом, среди обнаруженных аминокислотных

замен ряд мутаций имеет потенциальное клиническое значение, способствуя развитию ХГВ, например, локализованные в участках эпитопов Т-клеток (T12S, S21T/H/A/Q, F24Y, V27L, L55I, E64D, M66L/R, T67N/S, A69V/S, D83E, N87S, V89D, N90H, T91N, N92H, M93V, L95I, I97F/L, I105V, Y118D, P130A, A131T, P135S, N136D, T142L, L143R, T147C, V149I, R151P, S157T) и В-клеток (N74G/V, E77D, D78H, P79Q, A80I/T, D83E, N87S, V89D, T109S, F110L, E113Q/D, L116V/I, Y118D, P130A, A131T, P135S, N136D).

Особенно интересным результатом среди полученных данных нам кажется представленность мутаций вакцинного избегания ВГВ у всех доноров крови со скрытым ГВ. У изолята HBV_OBI_SPb132 с нехарактерным для генотипа D серотипом adw2, помимо замен, показанных для всех ВГВ D, присутствовали дополнительно три мутации R122K, T127P, Q129R, также известные как мутации, способствующие инфицированию вакцинированных лиц и снижению вероятности выявления HBsAg современными диагностическими наборами. Ряд исследователей сообщали, что пациенты с скГВ несут большее количество мутаций в области pre-S/S, чем пациенты с HBsAg-позитивным ХГВ, что может вызывать снижение или изменения в секреции антигена, приводя к невозможности его обнаружения [18, 25, 48]. Однако вирус при этом остается репликационно компетентным, может передаваться при трансфузионных манипуляциях и способен приводить к реактивации у подвергающихся иммуносупрессии реципиентов, что особенно важно, так как переливание крови и ее компонентов назначается в первую очередь больным в тяжелых состояниях. Кроме того, значительный процент реципиентов составляют женщины и дети с ослабленным иммунитетом, и переливание крови от доноров с скГВ беременным женщинам может увеличить риск вертикальной передачи ВГВ, а у детей стать причиной развития хронического заболевания за счет инфицирования в раннем возрасте [14]. Хотя расширение охвата вакцинацией против ВГВ как среди доноров, так и среди ре-

ципиентов несомненно значительно снижает риск трансфузионной передачи ВГВ, у 5–10% здоровых вакцинированных лиц не удавалось добиться ответа. В то же время у людей с скГВ нередко одновременно с ДНК вируса выявляют вакцинные антитела, а сами больные подтверждают факт вакцинации [19, 30, 38]. Можно предположить, что именно с обнаруженными escape-мутациями связана показанная нами высокая частота встречаемости скГВ среди доноров крови, так как escape-мутация изменяет выступающую петлю детерминанты «а» и ранее существовавшие нейтрализующие антитела не могут адекватно распознавать измененный эпитоп, позволяя мутантному вирусу избежать нейтрализации [32]. Чтобы подтвердить или опровергнуть это предположение необходимо продолжение исследований распространенности скГВ у доноров крови в разных регионах с последующей молекулярно-генетической характеристикой ВГВ.

Заключение

Показана распространенность скрытого хронического вирусного гепатита В среди первичных и кадровых доноров крови в Санкт-Петербурге. Выявление HBsAg-негативного ГВ связано как с истинным скрытым ХГВ, так и с ложным, обусловленным циркуляцией в популяции вариантов вируса с мутациями, препятствующими распознаванию HBsAg антителами при диагностике. Преобладание среди доноров крови изолятов ВГВ, несущих одновременно мутации, приводящие к диагностической неудаче тестов на HBsAg и профилактической неэффективности иммуноглобулина или вакцин и реактивации вируса, а также мутации, способствующие прогрессированию заболевания, очевидно несет угрозу здравоохранению и нуждается в дальнейшем изучении.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Бумбали С., Балде Т.Л., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Найденова Е.В., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Эсауленко Е.В., Тотолян А.А. Распространенность маркеров вирусного гепатита В среди доноров крови в Гвинейской Республике // Вопросы вирусологии. 2022. Т. 67, № 1. С. 59–68. [Boumbali S., Balde T.L., Semenov A.V., Ostantkova Yu.V., Serikova E.N., Naydenova E.V., Valutite D.E., Shchemelev A.N., Zueva E.B., Esaulenko E.V., Totolian A.A. The prevalence of viral hepatitis B markers among blood donors in the Republic of Guinea. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 59–68. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-92
2. Бумбали С., Серикова Е.Н., Балде Т.А.Л., Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Валутите Д.Э., Зуева Е.Б., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Аминокислотные замены в регионах CORE и HBsAg вируса гепатита В при моноинфекции и ВГВ/ВИЧ-коинфекции в Гвинейской Республике // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2021. Т. 13, № 3. С. 122–133. [Boumbaly S., Serikova E.N., Balde T.A.L., Ostantkova Yu.V., Schemelev A.N., Valutite D.E., Zueva E.B., Semenov A.V., Totolian Areg A. Amino acid substitutions in core and HBsAg regions of hepatitis B virus in patients with monoinfection and HBV/HIV-coinfection in the Republic of Guinea. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2021, vol. 13, no. 3, pp. 122–133. (In Russ.)] doi: 10.22328/2077-9828-2021-13-3-122-133

3. Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Аналитический обзор. 11 выпуск / Под ред. В.И. Покровского, А.А. Тотоляна. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2018. 112 с. [Viral hepatitis in the Russian Federation. Analytical review. Issue 11. Eds. V.I. Pokrovsky, A.A. Totolian. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2018. 112 p. (In Russ.)*]
4. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.Б., Габдрахманов И.А., Козлов К.В., Жданов К.В., Тотолян Арег А. Разнообразие геновариантов вируса гепатита В у военнослужащих // Журнал инфектологии. 2019. Т. 11, № 3. С. 46–53. [Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Gabdrakhmanov I.A., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Totolian Areg A. Diversity of hepatitis B virus genovariants in servicemen. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology, 2019, vol. 11, no. 3, pp. 46–53. (In Russ.)* doi: 10.22625/2072-6732-2019-11-3-46-53
5. Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Метод выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке на основе гнездовой ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени // Клиническая лабораторная диагностика. 2022. Т. 67, № 9. С. 530–537. [Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Semenov A.V., Totolian Areg A. Method for detecting hepatitis B virus DNA in biological material at low viral load based on nested PCR with real-time detection of three viral targets. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics, 2022, vol. 67, no. 9, pp. 530–537. (In Russ.)* doi: 10.51620/0869-2084-2022-67-9-530-537
6. Певцов Д.Э., Баховадинов Б., Барышев Б.А., Эстрина М.А., Кулагина И.И., Куга П.С., Кучер М.А., Кулагин А.Д., Багненко С.Ф. Совершенствование производственной деятельности отделения переливания крови ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава Российской Федерации // Трансфузиология. 2020. Т. 21, № 3. С. 227–238. [Pevtsov D.E., Bahovadinov B., Baryshev B.A., Estrina M.A., Kulagina I.I., Kuga P.S., Kucher M.A., Kulagin A.D., Bagnenko S.F. Improving the production activities of the blood transfusion department of the Pavlov First St. Petersburg State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. *Transfuziologia = Transfusiology, 2020, vol. 21, no. 3, pp. 227–238. (In Russ.)*]
7. Семенов А.В., Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Зуева Е.Б., Тотолян Арег А. Оптимизация алгоритма диагностики маркеров хронического гепатита В у пациентов с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией // Клиническая лабораторная диагностика. 2020. Т. 65, № 9. С. 574–579. [Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Zueva E.B., Totolian Areg A. Optimization of the algorithm for diagnosing chronic hepatitis B markers in patients with newly diagnosed HIV infection. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics, 2020, vol. 65, no. 9, pp. 574–579. (In Russ.)* doi: 10.18821/0869-2084-2020-65-9-574-579
8. Чететкин А.В., Данильченко В.В., Григорьян М.Ш., Воробей Л.Г., Плоский Р.А. Анализ показателей деятельности службы крови Российской Федерации в 2019 году // Трансфузиология. 2020. Т. 21, № 3. С. 200–210. [Chechetkin A.V., Danilchenko V.V., Grigoryan M.Sh., Sparrow L.G., Plotsky R.A. Analysis of performance indicators of the blood service of the Russian Federation in 2019. *Transfuziologia = Transfusiology, 2020, vol. 21, no. 3, pp. 200–210. (In Russ.)*]
9. Чететкин А.В., Данильченко В.В., Плоский Р.А., Григорьян М.Ш., Воробей Л.Г., Красильщикова И.В. Частота отводов от донорства вследствие выявления маркеров вирусных инфекций доноров крови и ее компонентов в Российской Федерации // Трансфузиология. 2021. Т. 22, № 1. С. 31–36. [Chechetkin A.V., Danilchenko V.V., Plotsky R.A., Grigoryan M.Sh., Sparrow L.G., Krasilshchikova I.V. The frequency of withdrawals from donation due to the detection of markers of viral infections of blood donors and its components in the Russian Federation. *Transfuziologia = Transfusiology, 2021, vol. 22, no. 1, pp. 31–36. (In Russ.)*]
10. Akram A., Islam S.M.R., Munshi S.U., Tabassum S. Detection of hepatitis B virus DNA among chronic and potential occult HBV patients in resource-limited settings by loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Viral. Hepat., 2018, vol. 25, pp. 1306–1311. doi: 10.1111/jvh.12931*
11. Allain J.P., Mihaljevic I., Gonzalez-Fraile M.I., Gubbe K., Holm-Harritshoj L., Garcia J.M., Brojer E., Erikstrup C., Saniewski M., Wernish L., Bianco L., Ullum H., Candotti D., Lelie N., Gerlich W.H., Chudy M. Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection. *Transfusion, 2013, vol. 53, pp. 1405–1415. doi: 10.1111/trf.12096*
12. Al-Qahtani A.A., Al-Anazi M.R., Nazir N., Abdo A.A., Sanai F.M., Al-Hamoudi W.K., Alswat K.A., Al-Ashgar H.I., Khan M.Q., Albenmoussa A., El-Shamy A., Alanazi S.K., Dela Cruz D., Bohol M.F.F., Al-Ahdal M.N. The correlation between hepatitis B virus precore/core mutations and the progression of severe liver disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol., 2018, vol. 8: 355. doi: 10.3389/fcimb.2018.00355*
13. Ashshi A.M. Detection of occult hepatitis B virus in anti-HBc positive/anti-HBs positive blood donors in Saudi-Arabia. *Res. J. Med. Sci., 2012, no. 6, pp. 61–65.*
14. Barro L., Drew V.J., Poda G.G., Tagny C.T., El-Ekiaby M., Owusu-Ofori S., Burnouf T. Blood transfusion in sub-Saharan Africa: understanding the missing gap and responding to present and future challenges. *Vox Sang., 2018, vol. 113, no. 8, pp. 726–736. doi: 10.1111/vox.12705*
15. Baxter C., Ngcapu S., Blackard J.T., Powell E.A., Penton P.K., Abdool Karim S.S. Frequency of hepatitis B virus resistance mutations in women using tenofovir gel as pre-exposure prophylaxis. *Viruses, 2019, vol. 11, no. 6: 569. doi: 10.3390/v11060569.*
16. Blach S., Zeuzem S., Manns M., Altraif I., Duberg A.-S., Muljono D.H., Waked I., Alavian S.M., Lee M.-H., Negro F., Abaalkhail F., Abdou A., Abdulla M., Abou Rached A., Aho I., Akarca U., Al Ghazzawi I., Al Kaabi S., Al Lawati F., Al Namaani K., Al Serkal Y., Al-Busafi S.A., Al-Dabal L., Aleman S., Alghamdi A.S., Aljumah A.A., Al-Romaihi H.E., Andersson M.I., Arendt V., Arkkila P., Assiri A.M., Baatarkhuu O., Bane A., Ben-Ari Z., Bergin C., Bessone F., Bihl F., Bizri A.R., Blachier M., Blasco A.J., Brandão Mello C.E., Bruggmann P., Brunton C.R., Calinas F., Chan H.L.Y., Chaudhry A., Cheinquer H., Chen C.-J., Chien R.-N., Choi M.S., Christensen P.B., Chuang W.-L., Chulanov V., Cisneros L., Clausen M.R., Cramp M.E., Craxi A., Croes E.A., Dalgard O., Daruich J.R., de Ledinghen V., Dore G.J., El-Sayed M.H., Ergör G., Esmat G., Estes C., Falconer K., Farag E., Ferraz M.L.G., Ferreira P.R., Flisiak R., Frankova S., Gamkrelidze I., Gane E., Garcia-Samaniego J., Khan A.G., Gountas I., Goldis A., Gottfredsson M., Grebely J., Gschwantler M., Pessôa M.G., Gunter J., Hajarizadeh B., Hajlssedig O., Hamid S., Hamoudi W., Hatzakis A., Himatt S.M., Hofer H., Hrstic I., Hui Y.-T., Hunyady B., Idilman R., Jafri W., Jahis R., Janjua N.Z., Jarčuška P., Jeruma A., Jonasson J.G., Kamel Y., Kao J.-H., Kaymakoglu S., Kershenobich D., Khamis J., Kim Y.S., Kondili L., Koutoubi Z., Krajden M., Krarup H., Lai M., Laleman W., Lao W., Lavanchy D., Lázaro P., Leleu H., Lesi O., Lesmana L.A., Li M., Liakina V., Lim Y.-S., Luksic B., Mahomed A., Maimets M., Makara M., Malu A.O., Marinho R.T., Marotta P., Mauss S., Memon M.S., Mendes Correa M.C., Mendez-Sanchez N., Merat S., Metwally A.M., Mohamed R., Moreno C., Mourad F.H., Müllhaupt B., Murphy K., Nde H., Njouom R., Nonkovic D., Norris S., Obekpa S., Oguiche S., Olafsson S., Oltman M., Omede O., Omuemu C., Opore-Sem O., Øvrehus A.L.H., Owusu-Ofori S., Oyunsuren T.S., Papatheodoridis G., Pasini K., Peltekian K.M., Phillips R.O., Pimenov N., Poustchi H., Prabdial-Sing N., Qureshi H.,

- Ramji A., Razavi-Shearer D., Razavi-Shearer K., Redae B., Reesink H.W., Ridruejo E., Robbins S., Roberts L.R., Roberts S.K., Rosenberg W.M., Roudot-Thoraval F., Ryder S.D., Safadi R., Sagalova O., Salupere R., Sanai F.M., Sanchez Avila J.F., Saraswat V., Sarmiento-Castro R., Sarrazin C., Schmelzer J.D., Schr ter I., Seguin-Devaux C., Shah S.R., Sharara A.I., Sharma M., Shevaldin A., Shiha G.E., Sievert W., Sonderup M., Souliotis K., Speiciene D., Sperl J., St rkel P., Stauber R.E., Stedman C., Struck D., Su T.-H., Sypsa V., Tan S.-S., Tanaka J., Thompson A.J., Tolmane I., Tomasiewicz K., Valantinas J., Van Damme P., van der Meer A.J., van Thiel I., Van Vlierberghe H., Vince A., Vogel W., Wedemeyer H., Weis N., Wong V.W.S., Yaghi C., Yosry A., Yuen M., Yunihastuti E., Yusuf A., Zuckerman E., Razavi H. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.*, 2017, vol. 2, no. 3, pp. 161–176. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30181
17. Bottecchia M., Madej n A., Sheldon J., Garc a-Samaniego J., Barreiro P., Soriano V. Hepatitis B virus genotype A2 harbours an L217R polymorphism which may account for a lower response to adefovir. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2008, vol. 62, pp. 626–627. doi: 10.1093/jac/dkn207
 18. Bes M., Vargas V., Piron M., Casamitjana N., Esteban J.I., Vilanova N., Pinacho A., Quer J., Puig L., Guardia J., Sauleda S. T cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection. *J. Hepatol.*, 2012, vol. 56, pp. 765–774. doi: 10.1016/j.jhep.2011.11.011
 19. Candotti D., Assennato S.M., Laperche S., Allain J.P., Levicnik-Stezinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut*, 2019, vol. 68, no. 2, pp. 313–321. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316490
 20. Candotti D., Laperche S. Hepatitis B virus blood screening: need for reappraisal of blood safety measures? *Front. Med.*, 2018, vol. 5: 29. doi: 10.3389/fmed.2018.00029
 21. Caviglia G.P., Abate M.L., Tandoi F., Ciancio A., Amoroso A., Salizzoni M., Saracco G.M., Rizzetto M., Romagnoli R., Smedile A. Quantitation of HBV cccDNA in anti-HBc-positive liver donors by droplet digital PCR: a new tool to detect occult infection. *J. Hepatol.*, 2018, vol. 69, pp. 301–307. doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.021
 22. Cholongitas E., Haidich A.B., Apostolidou-Kiouti F., Chalevas P., Papatheodoridis G.V. Hepatitis B virus reactivation in HBsAg-negative, anti-HBc-positive patients receiving immunosuppressive therapy: a systematic review. *Ann. Gastroenterol.*, 2018, vol. 31, pp. 480–490. doi: 10.20524/aog.2018.0266
 23. Feindiri M., Kabbaj H., El Mzibri M., Belkadi B., Bouihat N., Filali-Maltouf A., Seffar M. Prevalence of hepatitis B virus infection markers among patients of Ibn Sina University Hospital Center (Rabat, Morocco). *Intervirology*, 2022, vol. 65, no. 2, pp. 80–86. doi: 10.1159/000518618
 24. Franz  M.S., Pollicino T., Raimondo G., Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection in hepatitis C virus negative chronic liver diseases. *Liver Int.*, 2022, vol. 42, pp. 963–972. doi: 10.1111/liv.15233
 25. Huang F.Y., Wong D.K., Seto W.K., Zhang A.Y., Lee C.K., Lin C.K., Fung J., Lai C.L., Yuen M.F. Sequence variations of full-length hepatitis B virus genomes in Chinese patients with HBsAg-negative hepatitis B infection. *PLoS One*, 2014, vol. 9: e99028. doi: 10.1371/journal.pone.0099028
 26. Ji D.Z., Pang X.Y., Shen D.T., Liu S.N., Goyal H., Xu H.G. Global prevalence of occult hepatitis B: a systematic review and meta-analysis. *J. Viral. Hepat.*, 2022, vol. 29, pp. 317–329. doi: 10.1111/jvh.13660
 27. Karimi G., Zadsar M., Vafaei N., Sharifi Z., Falah-Tafti M. Prevalence of antibody to Hepatitis B core antigen and Hepatitis B virus DNA in HBsAg negative healthy blood donors. *Virol. J.*, 2016, vol. 13: 36. doi: 10.1186/s12985-016-0492-8
 28. Kramvis A. Molecular characteristics and clinical relevance of African genotypes and subgenotypes of hepatitis B virus. *S. Afr. Med. J.*, 2018, vol. 108, no. 8b, pp. 17–21. doi: 10.7196/SAMJ.2018.v108i8b.13495
 29. Lok A.S., Zoulim F., Dusheiko G., Ghany M.G. Hepatitis B cure: from discovery to regulatory approval. *J. Hepatol.*, 2017, vol. 67, no. 4, pp. 847–861. doi: 10.1016/j.jhep.2017.05.008
 30. Loomba R., Liang T.J. Hepatitis B reactivation associated with immune suppressive and biological modifier therapies: current concepts, management strategies, and future directions. *Gastroenterology*, 2017, vol. 152, pp. 1297–1309. doi: 10.1053/j.gastro.2017.02.009
 31. Lorato M.M., Nomathamsanqa P.S. Prevalence and genotypic characterization of HBV in HIV-infected patients from Kwazulu-Natal, South Africa. *Research. Square*, 2020. doi: 10.21203/rs.3.rs-20564/v1
 32. Mabunda N., Zicai A.F., Ismael N., Vubil A., Mello F., Blackard J.T., Lago B., Duarte V., Moraes M., Lewis L., Jani I. Molecular and serological characterization of occult hepatitis B among blood donors in Maputo, Mozambique. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 2020, vol. 115: e200006. doi: 10.1590/0074-02760200006
 33. Mixson-Hayden T., Lee D., Ganova-Raeva L., Drobeniuc J., Stauffer W.M., Teshale E., Kamili S. Hepatitis B virus and hepatitis C virus infections in United States-bound refugees from Asia and Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2014, vol. 90, no. 6, pp. 1014–1020. doi: 10.4269/ajtmh.14-0068
 34. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Burkitbayev Z.K., Savchuk T.N., Totolian Areg A. Results of genotyping hepatitis virus B in HBsAg-negative blood donors in Astana, Kazakhstan. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 383–392. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-383-392
 35. Ozeki I., Nakajima T., Suii H., Tatsumi R., Yamaguchi M., Kimura M., Arakawa T., Kuwata Y., Ohmura T., Hige S., Karino Y., Toyota J. Analysis of hepatitis B surface antigen (HBsAg) using high-sensitivity HBsAg assays in hepatitis B virus carriers in whom HBsAg seroclearance was confirmed by conventional assays. *Hepatol. Res.*, 2018, vol. 48, pp. E263–E274. doi: 10.1111/hepr.12979
 36. Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F., Lok A.S. Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.*, 2019, vol. 71, no. 2, pp. 397–408. doi: 10.1016/j.jhep.2019.03.034
 37. Saitta C., Pollicino T., Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection: an update. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 7: 1504. doi: 10.3390/v14071504
 38. Seto W.K., Chan T.S., Hwang Y.Y., Wong D.K., Fung J., Liu K.S., Gill H., Lam Y.F., Lau E.H.Y., Cheung K.S., Lie A.K.W., Lai C.L., Kwong Y.L., Yuen M.F. Hepatitis B reactivation in occult viral carriers undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective study. *Hepatology*, 2017, vol. 65, pp. 1451–1461. doi: 10.1002/hep.29022
 39. Seto W.K., Chan T.S., Hwang Y.Y., Wong D.K., Fung J., Liu K.S., Gill H., Lam Y.F., Lie A.K.W., Lai C.L., Kwong Y.L., Yuen M.F. Hepatitis B reactivation in patients with previous hepatitis B virus exposure undergoing rituximab-containing chemotherapy for lymphoma: a prospective study. *J. Clin. Oncol.*, 2014, vol. 32, pp. 3736–3743. doi: 10.1200/JCO.2014.56.7081
 40. Shen S., Xie Z., Cai D., Yu X., Zhang H., Kim E.S., Zhou B., Hou J., Zhang X., Huang Q., Sun J., Guo H. Biogenesis and molecular characteristics of serum hepatitis B virus RNA. *PLoS Pathog.*, 2020, vol. 16, no. 10: e1008945. doi: 10.1371/journal.ppat.1008945

41. Shi Y., Wu Y.H., Wu W., Zhang W.J., Yang J., Chen Z. Association between occult hepatitis B infection and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Liver Int.*, 2012, vol. 32, pp. 231–240. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02481.x
42. Tallo T., Tefanova V., Primagi L., Schmidt J., Katargina O., Michailov M., Mukomolov S., Magnus L., Norder H. D2: major sub-genotype of hepatitis B virus in Russia and the Baltic region. *J. Gen. Virol.*, 2008, vol. 89, pp. 1829–1839. doi: 10.1099/vir.0.83660-0
43. Tian Q., Jia J. Hepatitis B virus genotypes: epidemiological and clinical relevance in Asia. *Hepatol. Int.*, 2016, vol. 10, no. 6, pp. 854–860. doi: 10.1007/s12072-016-9745-2
44. Wang H., Swann R., Thomas E., Innes H.A., Valerio H., Hayes P.C., Allen S., Barclay S.T., Wilks D., Fox R., Bhattacharyya D., Kennedy N., Morris J., Fraser A., Stanley A.J., Gunson R., McIntyre P.G., Hunt A., Hutchinson S.J., Mills P.R., Dillon J.F. Impact of previous hepatitis B infection on the clinical outcomes from chronic hepatitis C? A population-level analysis. *J. Viral Hepat.*, 2018, vol. 25, pp. 930–938. doi: 10.1111/jvh.12897
45. World Health Organization. Regional strategic framework for vaccine-preventable diseases and immunization in the Western Pacific 2021–2030. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789290619697> (15.06.2023)
46. World Health Organization. Hepatitis B. Key facts. URL: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> (20.06.2023)
47. Wose Kinge C.N., Bhoola N.H., Kramvis A. In vitro systems for studying different genotypes/sub-genotypes of hepatitis B virus: strengths and limitations. *Viruses*, 2020, vol. 12, no. 3: 353. doi: 10.3390/v12030353
48. Zhang L., Chang L., Laperche S., Ji H., Zhao J., Jiang X., Wang L., Candotti D. Occult HBV infection in Chinese blood donors: Role of N-glycosylation mutations and amino acid substitutions in S protein transmembrane domains. *Emerg. Microbes Infect.*, 2019, vol. 8, pp. 1337–1346. doi: 10.1080/22221751.2019.1663130

Авторы:

Останкова Ю.В., к.б.н., зав. лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Серикова Е.Н., научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Ширшова Н.Ю., к.м.н., главный врач ГБУЗ Городская поликлиника № 32, Санкт-Петербург, Россия;

Кусевичкая М.Б., к.м.н., врач акушер-гинеколог отделения оперативной гинекологии ГУЗ Городская клиническая больница № 31, Санкт-Петербург, Россия;

Горская О.А., к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клинической иммунологии с группой по диагностике СПИД ФГБНУ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия;

Басина В.В., к.м.н., ассистент кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия;

Машков И.А., зав. терапевтическим отделением, врач-гастроэнтеролог ГБУЗ Городская поликлиника № 99, Санкт-Петербург, Россия;

Зуева Е.Б., к.б.н., биолог отделения диагностики ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Щемелев А.Н., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Рейнгардт Д.Э., врач клинко-лабораторной диагностики отделения диагностики ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Давыденко В.С., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, аспирант ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Муккель Д.А., сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

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

Authors:

Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of immunology and Virology HIV Infection, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Serikova E.N., Researcher, Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Shirshova N.Yu., PhD (Medicine), Chief Physician, City Polyclinic No. 32, St. Petersburg, Russian Federation;

Kusevitskaya M.B., PhD (Medicine), Obstetrician-Gynecologist of the Department of Operative Gynecology, City Clinical Hospital No. 31, St. Petersburg, Russian Federation;

Gorskaya O.A., PhD (Medicine), Pathologist, Laboratory of Clinical Immunology with the AIDS Diagnostic Group, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, St. Petersburg, Russian Federation;

Basina V.V., PhD (Medicine), Assistant of the Department of Infectious Diseases Adults and Epidemiology St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Mashkov I.A., Head of Therapeutic Department, Gastroenterologist, City Polyclinic No. 99, St. Petersburg, Russian Federation;

Zueva E.B., PhD (Biology), Biologist, Department of Diagnostics of HIV Infection and AIDS-associated Diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Schemelev A.N., Junior Researcher, Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Reingardt D.E., Pathologist, Department of Diagnostics of HIV Infection and AIDS-associated Diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Davydenko V.S., Junior Researcher, Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, PhD Student, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Mukkel D.A., Laboratory Worker, Laboratory of Virology and Immunology of HIV Infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

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

РОЛЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В

А.Ф. Новикова, Л.Л. Попова, Д.Ю. Константинов

ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия

Резюме. Дисрегуляция иммунного ответа, возникающая при хроническом гепатите В (ХГВ), препятствует элиминации вируса и способствует прогрессированию инфекционного процесса. Цель — оценить эффективность (биохимическую, иммунологическую, вирусологическую) комплексной терапии препаратами тенофовир и рекомбинантный интерлейкин-2 (rIL-2) в лечении больных ХГВ. *Материалы и методы.* Проведен сравнительный анализ результатов лабораторного обследования больных ХГВ в двух группах сравнения, сопоставимых по полу, возрасту, стадии фиброза, вирусной нагрузке: I группа (n = 27) получала тенофовир, согласно принятым рекомендациям, и rIL-2, II группа (n = 25) — препарат тенофовир. *Результаты.* Перед стартом противовирусной терапии у всех больных ХГВ наблюдалось повышение уровня печеночных трансаминаз, щелочной фосфатазы и гаммаглутамилтранспептидазы от 1,2 до 5 норм, а также дисрегуляция клеточных факторов иммунитета со значимым снижением абсолютного числа CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ и повышением CD20⁺-лимфоцитов. Через 12 месяцев лечения у больных в наблюдаемых группах отмечена нормализация показателей цитолиза и холестаза с незначимыми межгрупповыми различиями. Содержание абсолютного числа CD4⁺, CD8⁺ Т-клеток и CD16⁺-лимфоцитов в I группе повысилось (на 24,7, 24,1, 34,5% соответственно, все p < 0,001 относительно исходных величин), чего не произошло в группе сравнения. Уровень CD20⁺-лимфоцитов в I группе пациентов ХГВ снизился на 35,9%, а во II — на 7,9% (p_{I-II} < 0,001). В I группе больных ХГВ уровень HBsAg через 12 месяцев лечения стал ниже на 52% (p < 0,001). *Выводы.* Проведенное пилотное исследование показало, что комплексная этиопатогенетическая терапия больных ХГВ тенофовиром и rIL-2 улучшает функциональное состояние печени, восстанавливает нарушенный баланс иммунокомпетентных клеток: повышая уровень CD4⁺, CD8⁺ Т-лимфоцитов, CD16⁺-лимфоцитов и снижая число CD20⁺-клеток, а также позволяет устойчиво снизить уровень HBsAg в сыворотке крови.

Ключевые слова: хронический гепатит В, тенофовир, противовирусная терапия, CD4⁺-лимфоциты, рекомбинантный интерлейкин-2, HBsAg.

THE ROLE OF RECOMBINANT INTERLEUKIN-2 IN TREATMENT OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B

Novikova A.F., Popova L.L., Konstantinov D.Yu.

Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Abstract. Dysregulated immune response occurring in chronic hepatitis B prevents the virus elimination and contributes to progression of the infectious process. The aim of the study was to evaluate the effectiveness (biochemical, immunologi-

Адрес для переписки:

Новикова Анастасия Федоровна
443079, Россия, г. Самара, ул. Карла Маркса, 165Б,
Самарский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 846 374-10-04 (доб. 6068).
E-mail: a.f.novikova@samsmu.ru

Contacts:

Anastasiya F. Novikova
443079, Russian Federation, Samara, Karla Marksa str., 165B,
Samara State Medical University.
Phone: +7 846 374-10-04 (add. 6068).
E-mail: a.f.novikova@samsmu.ru

Для цитирования:

Новикова А.Ф., Попова Л.Л., Константинов Д.Ю. Роль рекомбинантного интерлейкина-2 в лечении больных хроническим гепатитом В // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1141–1149.
doi: 10.15789/2220-7619-TRO-2063

Citation:

Novikova A.F., Popova L.L., Konstantinov D.Yu. The role of recombinant interleukin-2 in treatment of patients with chronic hepatitis B // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1141–1149. doi: 10.15789/2220-7619-TRO-2063

© Новикова А.Ф., Попова Л.Л., Константинов Д.Ю., 2023

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TRO-2063>

cal, virological) of combination treatment with tenofovir and Recombinant interleukin-2 in chronic hepatitis B patients. *Material and methods.* A comparative analysis of the results from laboratory examination of chronic hepatitis B patients in two comparison groups, comparable in sex, age, stage of fibrosis, viral load, was carried out: group I (n = 27) received tenofovir, according to the accepted recommendations, and recombinant interleukin-2 (rIL-2), group II (n = 25) — tenofovir. *Results.* Before the onset of antiviral therapy all patients with chronic hepatitis B had increased hepatic transaminases, alkaline phosphatase and gammaglutamyl transpeptidase from 1.2 to 5 norms as well as dysregulated cellular immunity factors with significantly decreased absolute count of CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ and increased CD20⁺ lymphocytes. After 12 months of treatment, patients in observation groups showed normalized cytolysis and cholestasis with insignificant intergroup differences. The level of absolute count of CD4⁺, CD8⁺ T-cells and CD16⁺ lymphocytes in the I group increased (by 24.7%, 24.1%, 34.5%, respectively, all p < 0.001 relative to the initial values), not observed in comparison group. The level of CD20⁺ lymphocytes in group 1 was decreased by 35.9%, and in group 2 — by 7.9% (p_{I-II} < 0.001). In group 1, the level of HBsAg after 12 months of treatment became lower by 52% (p < 0.001). *Conclusion.* The conducted pilot study showed that the combination etiopathogenetic therapy of patients with chronic hepatitis B using tenofovir and rIL-2 improves liver functional state, restores the disturbed balance of immunocompetent cells: by increasing level of CD4⁺, CD8⁺ T-lymphocytes, CD16⁺ lymphocytes and reducing the count of CD20⁺ cells, and also allows to steadily reduce blood serum HBsAg level.

Key words: chronic hepatitis B, CD4⁺ lymphocytes, tenofovir, antiviral therapy, recombinant interleukin-2, HBsAg.

Введение

Актуальность хронического гепатита В (ХГВ) обусловлена его значительной распространенностью в мире и в России (около 260 млн случаев во всем мире), тяжестью исходов и весомым вкладом в общую летальность (в мире до миллиона случаев в год) [2]. В России 90% больных ХГВ составляют пациенты с НВеАg-негативной фазой заболевания, поэтому подходы к их лечению имеют особую значимость [1]. Молекулярные и клеточные механизмы патогенеза ХГВ обеспечивают длительную персистенцию вируса гепатита В (ВГВ) в клетках хозяина, способствуя прогрессированию инфекционного процесса [14, 16, 24, 27]. Современная противовирусная терапия (ПВТ) синтетическими аналогами нуклеоз(т)идов (АН) не приводит к эрадикации вируса, а лишь ингибирует его репликацию [9, 10, 13]. У некоторых исследователей данные о развитии иммунной дисрегуляции на фоне ПВТ противоречивы [9, 12, 17, 22, 26]. Еще в 2012 г. Wonil C. с соавт. отметила, что больные ХГВ, получавшие лечение АН и достигшие авиремии, при сохранении в крови поверхностного антигена (НВеАg), имели низкий уровень реактивности ВГВ-специфичных Т-клеток, в связи с чем авторы рассматривают целесообразность применения иммуномодулирующих препаратов для улучшения противовирусного Т-клеточного ответа [10]. Arasli M. в своем исследовании делает вывод о том, что у пациентов с ХГВ в течение однолетнего курса лечения тенофовиром значительно снижается не только вирусная нагрузка, но и процент CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ nTreg [9]. Duan S.P. и соавт. отмечает, что через 48 недель терапии больных ХГВ тенофовиром статистически достоверной разницы по содержанию Т-лимфоцитов в сравнении с исходными данными и группой контроля не получено [12]. Tülek N. и соавт. в своей работе указывают на то, что у больных ХГВ и носи-

телей НВеАg уровень растворимого рецептора интерлейкина-2 (IL-2) и интерлейкин-10 (IL-10) в крови значительно выше значений группы здоровых лиц [22]. Wu J. и соавт. отмечают обратную корреляционную связь между уровнем CD4⁺ Т-лимфоцитов и длительностью персистенции вируса при ХГВ [26]. При изучении особенностей миелоидных супрессорных клеток (MDSC) как ключевого регулятора Т-лимфоцитов было показано, что при ХГВ ВГВ-специфичные CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоциты значительно ослабляли продукцию IL-2/IFN γ , при этом на фоне успешной терапии тенофовиром (12 месяцев) восстановления функции Т-лимфоцитов не произошло [17]. Описанные нарушения в различных звеньях иммунной системы обосновывают необходимость поиска иммуноориентированного лечения.

Рекомбинантный интерлейкин-2 (rIL-2) является структурным и функциональным аналогом эндогенного человеческого IL-2. Взаимодействуя с рецепторами клеток иммунной системы, он индуцирует рост, дифференцировку и пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, олигодендроглиальных клеток, эпидермальных клеток Лангерганса, а также стимулирует цитолитическую активность натуральных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов, повышает устойчивость клеток к апоптозу [15]. В ряде клинических исследований при лечении заболеваний, ведущим патогенетическим звеном которых является нарушение иммунной регуляции (аутоиммунные, онкологические, инфекционные), описаны положительные результаты применения rIL-2 [8, 11, 13, 15, 18, 19, 21, 23, 25, 28]. Включение rIL-2 в схему ПВТ при лечении больных ХГВ обусловлено соответствием его иммуномодулирующих свойств структуре иммунных нарушений при ХГВ.

Кафедра инфекционных болезней с эпидемиологией ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России с 2006 г. изучает влияние иммуноориен-

тированной терапии на состояние клеточного и гуморального иммунитета у больных хроническими вирусными гепатитами В, С. При проведении ПВТ у больных хроническим гепатитом С сочетанием пегилированного интерферона альфа (PegIFN α) и rIL-2 было показано положительное влияние rIL-2 на переносимость PegIFN α (купирование цитопенического синдрома) и параметры клеточного звена иммунитета (восстановление содержания НК-клеток и Т-лимфоцитов) [7]. С целью оптимизации этиотропного лечения у больных ХГВ было исследовано состояние клеточного иммунитета при назначении ламивудина в сочетании с rIL-2. Исследование показало, что наряду со снижением содержания ДНК ВГВ и HBeAg, происходит восстановление уровня CD4⁺ и CD16⁺ Т-лимфоцитов [5, 6]. Функциональные особенности циркуляции IFN α , IFN γ и IL-2 на фоне лечения больных ХГВ энтекавиром в режиме монотерапии были отражены в работах Поповой Л.Л., Зайцевой Е.А. Было показано, что у больных HBeAg-негативным ХГВ до начала ПВТ выявлено значимое снижение уровня IL-2, сывороточной и индуцированной продукции IFN α , спонтанной и индуцированной продукции IFN γ по сравнению с группой контроля, при этом, через 12 месяцев лечения сохранялся сниженный уровень IL-2 и индуцированной продукции IFN α [3, 4].

С учетом известных иммунных нарушений, возникающих при ВГВ-инфекции, мы провели пилотное исследование по изучению результата включения rIL-2 в качестве адъювантного препарата в стандартную терапию ХГВ синтетическим нуклеоз(т)идным аналогом тенофовиром.

Цель исследования — оценить эффективность (биохимическую, иммунологическую, вирусологическую) комплексной терапии препаратами тенофовиром и rIL-2 в лечении больных ХГВ.

Материалы и методы

В клинике инфекционных болезней ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России были проанализированы результаты динамического клинико-лабораторного и инструментального обследования больных ХГВ, получающих ПВТ. Диагноз ХГВ был сформулирован в соответствии с клиническими рекомендациями по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом В Европейской ассоциации по изучению заболеваний печени (EASL, 2017). Критерии включения в исследование: мужчины и женщины в возрасте от 18 до 50 лет с подтвержденным диагнозом ХГВ (HBeAg негативный, без дельта-агента), не получавшие ранее ПВТ, с повышенными значениями АЛАТ, фиброзом печени F2–F3 стадии по METAVIR, вирусной нагрузкой

ДНК ВГВ более 2000 МЕ/мл. В исследование не были включены больные острыми вирусными гепатитами, циррозом печени, а также пациенты с микст-инфекцией (HCV, ВИЧ), аутоиммунным, токсико-аллергическим поражением печени, пациенты с болезнями накопления (гемохроматоз, болезнь Вильсона–Коновалова), онкологическими заболеваниями, системными заболеваниями соединительной ткани, сахарным диабетом, беременностью и лактацией.

Для иммуноферментного определения HBe-антигена вируса гепатита В (качественно и количественно) и ДНК ВГВ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовался набор реагентов «ВекторHBeAg-антитела» и «Реал-Бест ДНК ВГВ» соответственно, чувствительностью 15 МЕ/мл (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Определение биохимических показателей выполнялось при помощи анализатора «Hitachi-902» (Roche Diagnostics, Япония). Для идентификации популяций и субпопуляций лимфоцитов использовали стандартную панель моноклональных антител производства Becton Dickinson, включающую антитела к CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺ дифференцировочным антигенам лейкоцитов и соответствующие изотипические контроли. Ультразвуковое исследование органов брюшной полости проводилось на сканере «Toshiba 370 A Powervision 6000». Стадию фиброза печени определяли методом эластографии на аппарате «FibroScan FS 502». Математико-статистическая обработка данных производилась с использованием приложений Microsoft Excel пакета Office 2016 и Statistica (StatSoft) версии 10.0.

Все пациенты в качестве противовирусного лечения получали препарат тенофовир 300 мг по 1 таблетке 1 раз в день не менее 12 месяцев. В качестве иммуноориентированной терапии был назначен rIL-2 российского производства. Схема была разработана и запатентована на кафедре инфекционных болезней с эпидемиологией ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (патент на изобретение РФ № 2365381 от 27.06.2008). Курс иммуноориентированной терапии включал в себя внутривенное капельное введение rIL-2 в дозе 500 000 МЕ, со скоростью 1–2 мл/мин в течение 4–6 ч 2 раза в неделю — 1 месяц, затем указанный препарат вводили подкожно по 500 000 МЕ 2 раза в неделю в течение 2 месяцев. Повторный курс введения rIL-2 (подкожно по 500 000 МЕ 2 раза в неделю в течение 1 месяца) проводился на двенадцатом месяце лечения тенофовиром. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России с соблюдением закона о персональных данных РФ и проведено на основе письменного информированного согласия пациентов.

Среди пациентов ($n = 52$), планирующих лечение тенофовиром, были сформированы две группы сравнения, сопоставимые по полу, возрасту, стадии фиброза, вирусной нагрузке (табл. 1). I группу ($n = 27$) составили пациенты, которые получали тенофовир, согласно принятым рекомендациям, и гИЛ-2 в качестве терапии сопровождения; пациенты II группы ($n = 25$) лечились тенофовиром в режиме монотерапии.

Для сравнительной оценки показателей клеточных факторов иммунитета использовали результаты обследования здоровых доноров — группа К ($n = 25$).

Результаты

Результаты исследования биохимических показателей крови у пациентов в группах сравнения представлены в табл. 2.

Перед стартом противовирусной терапии у всех больных ХГВ зарегистрировано повышение трансаминаз до 5 норм. Увеличение уровня щелочной фосфатазы (ЩФ) и гаммаглута-

милтранспептидазы (ГГТП) регистрировалось от 1,2 до 3 норм в I группе у 68 и 72% больных, а во II группе — в 66 и 73% случаях соответственно. Показатели общего билирубина у больных I группы в 33%, а во II — в 37% случаев превышали верхнюю границу референсных значений максимально до 2,5 норм. Статистически значимых отличий между биохимическими показателями исследуемых групп перед началом ПВТ не выявлено ($p_{I-II} > 0,05$).

Через 12 месяцев лечения у всех больных I группы нормализовался уровень АЛТ и АСТ, общего билирубина ($p^I < 0,001$). Значения ГГТП и ЩФ в 93% случаев также снизились до референсных значений (все $p^I < 0,001$), по сравнению с показателями на старте терапии. Во II группе у 88% больных ХГВ также зарегистрирована нормализация функциональных проб печени: АЛТ, АСТ, ГГТП (все $p^{II} < 0,001$) и ЩФ, $p^{II} < 0,05$, относительно их значений до лечения. При сравнении биохимических показателей через 12 месяцев лечения I и II групп получены статистически значимые различия по показателям цитолиза и холестаза ($p_{I-II} < 0,01$ и $p_{I-II} < 0,001$ соответственно).

Было исследовано абсолютное содержание CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD16⁺-, CD20⁺-лимфоцитов в сыворотке крови больных ХГВ до лечения и через 12 месяцев наблюдения на фоне ПВТ в описанных группах сравнения.

Результаты исследования уровня наиболее значимых субпопуляций лимфоцитов представлены в табл. 3.

На старте ПВТ у пациентов I и II групп значения основных субпопуляций лимфоцитов: CD4⁺ (в 93 и 95% случаях соответственно), CD8⁺ (в 87 и 84%) и CD16⁺ (в 82 и 77%) — были у нижней границы нормы, а CD20⁺ (в 87 и 90%) регистрировались выше нормы и статистически значимо отличались от соответствующих показателей группы контроля (все $p_{I-K} < 0,001$, $p_{II-K} < 0,001$).

Через 12 месяцев лечения в I группе пациентов абсолютное содержание CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток повысилось на 24 и 27% соответственно (все $p^I < 0,001$), что оказалось в среднем в 3–4 раза выше, чем во II группе ($p_{I-II} < 0,01$). Во II группе пациентов при внутригрупповом сравнении средних значений CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов до старта и через 12 месяцев лечения различия были статистически не значимыми ($p^{II} > 0,05$).

Уровень CD16⁺ клеток у больных ХГВ через 12 месяцев лечения в I группе повысился на 34% и стал выше, чем во II группе ($p_{I-II} < 0,001$).

Повышенное содержание CD20⁺-лимфоцитов, установленное у больных обеих групп на старте ПВТ, через 12 месяцев лечения в I группе пациентов снизилось на 31% и стало соответствовать значениям группы контроля,

Таблица 1. Сравнительная характеристика больных ХГВ разных групп наблюдения

Table 1. Comparative characteristics of chronic hepatitis B patients in different observation groups

Показатели Parameters	Группы пациентов с ХГВ Chronic hepatitis B patients groups		P _{I-II}
	I группа 1st group n = 27	II группа 2nd group n = 25	
Возраст, лет Age, years	39,6±8,7 (ДИ 33,1845– 48,1419)	38,8±7,4 (ДИ 32,1788– 46,1491)	0,945
Мужской пол, % Male, %	42%	44%	0,662
Женский пол, % Female, %	58%	56%	0,778
ДНК ВГВ, 2000– 20 000 МЕ/мл HBV DNA, 2000– 20 000 IU/ml	15%	18%	0,572
ДНК ВГВ, > 20 000 МЕ/мл HBV DNA, > 20 000 IU/ml	85%	82%	0,765
HBsAg, 2000– 30 000 МЕ/мл HBsAg, 2000– 30 000 IU/ml	87%	86%	0,547
HBsAg, > 30 000 МЕ/мл HBsAg, > 30 000 IU/ml	13%	14%	0,879
F2 по METAVIR F2 by METAVIR	78%	76%	0,678
F3 по METAVIR F3 by METAVIR	22%	24%	0,887

Таблица 2. Биохимические показатели крови у больных ХГВ разных групп наблюдения перед ПВТ и через 12 месяцев от начала ее проведения в зависимости от способа лечения ($\bar{X} \pm s$)Table 2. Blood biochemical parameters in chronic hepatitis B patients from various observation groups before AVT and 12 months after the onset based on treatment approach ($\bar{X} \pm s$)

Показатели (норма) Parameters (norm)	Период наблюдения больных ХГВ Chronic hepatitis B patients observation period	Группы пациентов с ХГВ Chronic hepatitis B patients groups		p
		I группа 1st group n = 27	II группа 2nd group n = 25	
Общий билирубин, мкмоль/л (3,2–20,0) Total bilirubin, $\mu\text{mol/l}$	до лечения before treatment	18,1 \pm 1,5 (ДИ 17,5147–18,7812)	18,5 \pm 0,3 (ДИ 17,9111–19,1265)	$p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment	12,1 \pm 1,3 (ДИ 11,5412–12,7811)	17,1 \pm 0,7 (ДИ 16,5112–17,7835)	$p_{I-II} < 0,05$
		$p'_I < 0,001$	$p'_{II} < 0,05$	
Общий белок, г/л (65–84) Total protein, g/l	до лечения before treatment	69,3 \pm 0,4 (ДИ 68,7412–71,0102)	68,1 \pm 0,3 (ДИ 67,5412–68,7813)	$p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment	70,3 \pm 0,1 (ДИ 69,7414–70,9125)	68,4 \pm 0,9 (ДИ 67,8145–69,0201)	$p_{I-II} < 0,05$
		$p'_I < 0,05$	$p'_{II} > 0,05$	
Альбумин, г/л (34–53) Albumin, g/l	до лечения before treatment	50,1 \pm 0,2 (ДИ 49,5247–50,7814)	49,9 \pm 0,7 (ДИ 49,1245–51,5718)	$p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment	52,4 \pm 0,1 (ДИ 51,8745–53,0214)	51,8 \pm 0,8 (ДИ 51,2147–52,4517)	$p_{I-II} > 0,05$
		$p'_I < 0,05$	$p'_{II} < 0,05$	
Гамма-глобулин, г/л (7–15) Gamma-globulin, g/l	до лечения before treatment	27,5 \pm 0,7 (ДИ 26,9117–28,1215)	26,5 \pm 1,1 (ДИ 25,9147–31,1265)	$p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment	21,1 \pm 0,6 (ДИ 20,5412–21,7965)	23,8 \pm 0,8 (ДИ 23,2175–24,4514)	$p_{I-II} < 0,01$
		$p'_I < 0,001$	$p'_{II} < 0,05$	
АЛТ, Ед/л (до 38) ALT, U/l	до лечения before treatment	117,6 \pm 11,3 (ДИ 117,0103–118,2154)	126,5 \pm 19,5 (ДИ 125,9115–127,1423)	$p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment	47,6 \pm 6,7 (ДИ 46,5412–48,2574)	67,4 \pm 5,3 (ДИ 66,8415–68,0203)	$p_{I-II} < 0,01$
		$p'_I < 0,001$	$p'_{II} < 0,001$	
АсАТ, Ед/л (до 40) AST, U/l	до лечения before treatment	79,5 \pm 8,3 (ДИ 78,9124–80,1547)	78,3 \pm 9,5 (ДИ 77,6452–78,9116)	$p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment	29,5 \pm 2,3 (ДИ 28,9147–30,1427)	38,4 \pm 2,5 (ДИ 37,8456–39,0104)	$p_{I-II} < 0,01$
		$p'_I < 0,001$	$p'_{II} < 0,001$	
ЩФ, Ед/л (30–120) AP, U/l	до лечения before treatment	253,5 \pm 6,8 (ДИ 252,9115–254,1817)	252,4 \pm 8,7 (ДИ 251,8415–253,0013)	$p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment	53,5 \pm 7,8 (ДИ 52,9418–54,1578)	87,4 \pm 9,5 (ДИ 86,8712–88,0021)	$p_{I-II} < 0,001$
		$p'_I < 0,001$	$p'_{II} < 0,001$	
ГГТП, Ед/л (до 50) GGT, U/l	до лечения before treatment	89,3 \pm 7,6 (ДИ 88,7541–89,9112)	88,2 \pm 1,1 ДИ 87,6124–88,8114	$p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment	57,8 \pm 4,1 (ДИ 57,2113–58,4517)	78,3 \pm 4,3 (ДИ 77,7145–78,9112)	$p_{I-II} < 0,001$
		$p'_I < 0,001$	$p'_{II} < 0,05$	

Примечание. Здесь и далее: $\bar{X} \pm s$ — среднее \pm стандартное отклонение; p — вероятность ошибочного принятия альтернативной гипотезы о наличии межгрупповых различий; p' — вероятность ошибочного принятия альтернативной гипотезы о наличии внутригрупповых различий; p'_I — I группа, p'_{II} — II группа.

Note. Hereinafter: $\bar{X} \pm s$ — mean \pm standard deviation; p — probability of erroneous acceptance of an alternative hypothesis about present intergroup differences; p' — probability of erroneous acceptance of an alternative hypothesis about present intragroup differences: p'_I — group I, p'_{II} — group II.

Таблица 3. Характеристика основных показателей клеточных факторов иммунитета у больных ХГВ разных групп наблюдения перед ПВТ и через 12 месяцев от начала ее проведения в зависимости от способа лечения ($\bar{X} \pm s$)

Table 3. Characteristics of major cellular immune parameters in chronic hepatitis B patients from various observation groups before AVT and after 12 months after the onset based on treatment approach ($\bar{X} \pm s$)

Показатели (норма) Parameters (norm)	Период наблюдения больных ХГВ Chronic hepatitis B patients observation period	Группы обследуемых/Study groups			p
		Контрольная группа, К Control group, K n = 25	I группа (ХГВ) 1st group (chronic hepatitis B) n = 27	II группа (ХГВ) 2nd group (chronic hepatitis B) n = 25	
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$ (4,0–9,0) Leukocytes, $\times 10^9/\text{л}$	до лечения before treatment	5,11 \pm 0,02	4,80 \pm 0,08 (ДИ 4,7431–4,8643)	4,59 \pm 0,02 (ДИ 4,5314–4,6532)	$p_{I-K} < 0,001$ $p_{II-K} < 0,001$ $p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment		5,06 \pm 0,07 (ДИ 5,0090–5,1169)	4,51 \pm 0,18 (ДИ 4,4435–4,5714)	$p_{I-II} < 0,001$ $p_{I-K} > 0,05$
			$p^I < 0,01$	$p^{II} > 0,05$	$p_{II-K} < 0,05$
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$ (1,2–2,5) Lymphocytes, $\times 10^9/\text{л}$	до лечения before treatment	1,97 \pm 0,05	1,69 \pm 0,01 (ДИ 1,6405–1,7536)	1,67 \pm 0,08 (ДИ 1,6201–1,7213)	$p_{I-K} < 0,001$ $p_{II-K} < 0,001$ $p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment		1,92 \pm 0,05 (ДИ 1,8615–1,9814)	1,73 \pm 0,03 (ДИ 1,6714–1,7956)	$p_{I-II} < 0,001$ $p_{I-K} < 0,01$
			$p^I < 0,001$	$p^{II} > 0,05$	$p_{II-K} < 0,001$
CD3 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$ (0,95–1,8) CD3 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	до лечения before treatment	1,33 \pm 0,01	1,23 \pm 0,01 (ДИ 1,1712–1,2945)	1,25 \pm 0,04 (ДИ 1,1912–1,3115)	$p_{I-K} < 0,001$ $p_{II-K} < 0,001$ $p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment		1,29 \pm 0,02 (ДИ 1,1457–1,4373)	1,25 \pm 0,01 (ДИ 1,1948–1,3145)	$p_{I-II} < 0,01$ $p_{I-K} < 0,01$
			$p^I < 0,01$	$p^{II} > 0,05$	$p_{II-K} < 0,001$
CD4 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$ (0,57–1,1) CD4 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	до лечения before treatment	0,85 \pm 0,07	0,65 \pm 0,05 (ДИ 0,5912–0,7125)	0,63 \pm 0,07 (ДИ 0,5713–0,6918)	$p_{I-K} < 0,001$ $p_{II-K} < 0,001$ $p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment		0,81 \pm 0,01 (ДИ 0,7547–0,8712)	0,72 \pm 0,03 (ДИ 0,6617–0,7825)	$p_{I-II} < 0,01$ $p_{I-K} < 0,01$
			$p^I < 0,001$	$p^{II} > 0,05$	$p_{II-K} < 0,001$
CD8 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$ (0,45–0,85) CD8 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	до лечения before treatment	0,56 \pm 0,03	0,41 \pm 0,03 (ДИ 0,3516–0,4719)	0,42 \pm 0,01 (ДИ 0,3618–0,4835)	$p_{I-K} < 0,001$ $p_{II-K} < 0,001$ $p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment		0,54 \pm 0,02 (ДИ 0,4811–0,6002)	0,43 \pm 0,03 (ДИ 0,3614–0,4917)	$p_{I-II} < 0,001$ $p_{I-K} > 0,05$
			$p^I < 0,001$	$p^{II} > 0,05$	$p_{II-K} < 0,001$
CD16 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$ (0,18–0,42) CD16 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	до лечения before treatment	0,35 \pm 0,03	0,18 \pm 0,03 (ДИ 0,1254–0,2413)	0,19 \pm 0,01 (ДИ 0,1356–0,2517)	$p_{I-K} < 0,001$ $p_{II-K} < 0,001$ $p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment		0,29 \pm 0,02 (ДИ 0,2345–0,3514)	0,21 \pm 0,01 (ДИ 0,1565–0,2748)	$p_{I-II} < 0,001$ $p_{I-K} < 0,001$
			$p^I < 0,001$	$p^{II} > 0,05$	$p_{II-K} < 0,001$
CD20 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$ (0,15–0,40) CD20 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	до лечения before treatment	0,29 \pm 0,02	0,39 \pm 0,01 (ДИ 0,3378–0,4569)	0,38 \pm 0,02 (ДИ 0,3214–0,4418)	$p_{I-K} < 0,001$ $p_{II-K} < 0,001$ $p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment		0,25 \pm 0,03 (ДИ 0,1925–0,3156)	0,35 \pm 0,02 (ДИ 0,2917–0,4165)	$p_{I-II} < 0,001$ $p_{I-K} > 0,05$
			$p^I < 0,001$	$p^{II} > 0,05$	$p_{II-K} < 0,001$
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (1,5–2,5)	до лечения before treatment	1,91 \pm 0,05	1,44 \pm 0,08 (ДИ 1,3814–1,5006)	1,48 \pm 0,11 (ДИ 1,4257–1,5463)	$p_{I-K} < 0,001$ $p_{II-K} < 0,001$ $p_{I-II} > 0,05$
	через 12 месяцев лечения after 12 month of treatment		1,64 \pm 0,01 (ДИ 1,5812–1,7005)	1,58 \pm 0,02 (ДИ 1,5214–1,6474)	$p_{I-II} < 0,01$ $p_{I-K} < 0,001$
			$p^I < 0,01$	$p^{II} > 0,05$	$p_{II-K} < 0,001$

Примечание. То же, что и для табл. 2.

Note. The same as for Table 2.

чего не произошло в группе сравнения, где снижение составило 8% ($p_{I-II} < 0,001$).

Данные по динамике содержания ДНК ВГВ и уровня HBsAg в сыворотке крови у больных ХГВ представлены в табл. 4.

До начала противовирусного лечения у больных ХГВ регистрировалась вирусная нагрузка ДНК ВГВ от 2×10^4 до 2×10^7 МЕ/мл, уровень HBsAg — от 2000 до 50 000 МЕ/мл. На фоне лечения тенофовиром была достигнута авиремия у 100% больных в обеих группах ($p^I_1 < 0,001$ и $p^I_{II} < 0,001$ соответственно).

Содержание HBsAg менялось не однозначно. В I группе больных ХГВ, получавших комплексную терапию, уровень HBsAg через 12 месяцев лечения стал на 52% ниже, чем до начала терапии ($p^I_1 < 0,001$). При этом в группе сравнения увеличилась дисперсия этого показателя, так как наряду со снижением уровня HBsAg, у 15% пациентов наблюдался его рост. В итоге, при общей тенденции к уменьшению средних значений HBsAg во II группе, межгрупповые различия оказались значимыми ($p_{I-II} < 0,01$).

Обсуждение

В нашем пилотном исследовании зарегистрировано наличие у больных ХГВ дисбаланса в содержании основных субпопуляций лимфоцитов со снижением уровня CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, CD16⁺-лимфоцитов и повышением CD20⁺. Это согласуется с выводами других исследователей о негативном влиянии ВГВ как на врожденный, так и на адаптивный иммунитет в процессе длительной персистенции в иммунных клетках хозяина [27].

Возможности адъювантной терапии с иммунореставрационной целью обсуждается научным сообществом, однако единого мнения по выбору

иммуностропного препарата нет. Так, исследователи, применявшие при лечении больных ХГВ АН в сочетании с PegIFN α , получили данные о снижении уровня HBsAg, а также увеличении активности NK-клеток [18]. Zhang X. в своем обзоре фокусируется на роли ВГВ-специфического ответа Т-клеток, обсуждая новые стратегии в применении иммуномодулирующих препаратов, направленных на активацию противовирусного иммунитета с целью излечения ХГВ [29]. Wang D. и соавт., назначавшие гІL-2 после проведенной терапии ХГВ PegIFN α , отмечают снижение количества Treg и степень экспрессии белка программируемой гибели клеток 1 (PD-1), а также усиление функции ВГВ-специфичных CD8⁺ Т-клеток [23]. Qi W. и соавт. сообщают об эффективности раннего введения гІL-2 в противовирусную схему лечения больных ХГВ, так как это способствует снижению уровня HBsAg в крови [19].

В нашем исследовании было показано, что при комплексном лечении больных ХГВ тенофовиром с гІL-2 по сравнению с пациентами, принимавшими тенофовир в режиме монотерапии, статистически значимо уменьшается дисбаланс в содержании основных субпопуляций лимфоцитов, за счет восстановления уровня CD4⁺ и CD8 Т-лимфоцитов, ИРИ и уменьшения числа CD20⁺-клеток. Также следует отметить более значительное и устойчивое снижение количества HBsAg. Аналогичный результат был описан в работе Wu D. при комбинированной терапии интерфероном, интерлейкином-2 и энтекавиром, при этом в процессе лечения отмечалась корреляция низкого уровня HBsAg с частичным восстановлением NK-клеток [25].

В настоящее время сроки завершения лечения больных ХГВ АН не определены. Длительный (многолетний) прием этих препаратов ориентирован на достижение серокон-

Таблица 4. Динамика вирусологического ответа и уровня HBsAg у лиц различных групп наблюдений ($\bar{X} \pm s$)

Table 4. Dynamics of virological response and HBsAg levels in individuals from different observation groups ($\bar{X} \pm s$)

Показатели Parameters	Период наблюдения больных ХГВ Chronic hepatitis B patients observation period	Группы пациентов с ХГВ Chronic hepatitis B patients groups		p
		I группа 1st group n = 27	II группа 2nd group n = 25	
ДНК ВГВ, МЕ/мл HBV DNA, IU/ml	до лечения before treatment	1 230 785 \pm 92 786,3	1 345 187 \pm 82 548,5	$p_{I-II} > 0,05$
	лечение через 12 месяцев after 12 month of treatment	0	0	$p_{I-II} > 0,05$
	p^I_1	$p^I_1 < 0,001$	$p^I_{II} < 0,001$	
HBsAg, МЕ/мл HBsAg, IU/ml	до лечения before treatment	28 475,3 \pm 1728,5	26 895,3 \pm 1121,3	$p_{I-II} > 0,05$
	лечение через 12 месяцев after 12 month of treatment	14 756,3 \pm 1278,3	21 646,5 \pm 2387,1	$p_{I-II} < 0,01$
	p^I_1	$p^I_1 < 0,001$	$p^I_{II} < 0,05$	

Примечание. То же, что и для табл. 2.

Note. The same as for Table 2.

версии по HBsAg, что происходит крайне редко. В исследовании Rivino L. показана роль функциональных ВГВ-специфичных Т-клеток в качестве кандидата на иммунологический биомаркер для безопасного прекращения терапии у больных ХГВ [20]. Это согласуется с данными нашего исследования об уменьшении дисбаланса в содержании CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в сочетании с устойчивым снижением уровня HBsAg, что может учитываться при определении сроков ПВТ у больных ХГВ.

Выводы

Проведенное пилотное исследование показало, что комплексная этиопатогенетическая тера-

пия больных ХГВ тенофовиром и гИЛ-2 улучшает функциональное состояние печени, восстанавливает нарушенный баланс иммунокомпетентных клеток, повышая количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, CD16⁺-лимфоцитов и снижая число CD20⁺-клеток, а также позволяет устойчиво снизить уровень HBsAg в сыворотке крови.

В дальнейшем целесообразно исследовать состояние других компонентов иммунореактивности при проведении предложенной схемы лечения ХГВ.

Для повышения практической значимости предложенной комплексной терапии больных ХГВ тенофовиром и гИЛ-2 следует оценить ее эффективность и переносимость у большего числа пациентов.

Список литературы/References

1. Абдурахманов Д.Т. Хронический гепатит В и D. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 288 с. [Abdurahmanov D.T. Chronic hepatitis B and D. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 288 p. (In Russ.)]
2. ВОЗ. Гепатит В. [WHO. Hepatitis B (In Russ.)] URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> (09.07.2021)
3. Зайцева Е.А., Попова Л.Л., Константинов Д.Ю. Динамика отдельных показателей цитокинового спектра у больных с HBeAg-негативным гепатитом В на фоне проведения противовирусной терапии // Уральский медицинский журнал. 2017. № 1 (145). С. 73–77. [Zayceva E.A., Popova L.L., Konstantinov D.Y. The individual dynamics of the cytokine spectrum in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B on the background of antiviral therapy. *Ural'skii meditsinskii zhurnal = Ural Medical Journal*, 2017, no. 1 (145), pp. 73–77. (In Russ.)]
4. Зайцева Е.А., Попова Л.Л., Константинов Д.Ю., Недугов Г.В. Новые возможности прогнозирования исходов противовирусной терапии у больных хроническим гепатитом В // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2018. № 3. С. 47–50. [Zaitseva E.A., Popova L.L., Konstantinov D.Y., Nedugov G.V. New possibilities of predicting the outcomes of antiviral therapy in patients with chronic hepatitis B. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2018, no. 3, pp. 47–50. (In Russ.)] doi: 10.18565/epidem.2018.3.47-50
5. Константинова Е.А., Константинов Д.Ю., Попова Л.Л. Роль иммуноопосредованной терапии при рецидиве HBeAg-негативного гепатита В // Поликлиника. 2015. № 1-1. С. 18–20. [Konstantinova E.A., Konstantinov D.Yu., Popova L.L. The role of immune-mediated therapy in relapsed HBeAg-negative hepatitis B. *Poliklinika = Polyclinic*, 2015, no. 1-1, pp. 18–20. (In Russ.)]
6. Патент № 2365381 Российская Федерация, МПК А61К 38/20 (2006.01), А61Р 1/16 (2006.01), А61К 38/21 (2006.01). Способ лечения хронического вирусного гепатита В. № 2006145918/14; заявлено 22.12.2006; опубликовано : 27.08.2009 / Попова Л.Л., Мельникова Е.А., Смирнов М.Н., Суздальцев А.А., Юрченко Н.Г., Константинов Д.Ю. Патентообладатель: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет». 6 с. [Patent No. 2365381 Russian Federation, Int. Cl. A61K 38/20 (2006.01), A61P 1/16 (2006.01), A61K 38/21 (2006.01). Method of chronic virus hepatitis B treatment. No. 2006145918/14; application: 22.12.2006; date of publication 27.08.2009 / Popova L.L., Mel'nikova E.A., Smirnov M.N., Suzdal'tsev A.A., Yurchenko N.G., Konstantinov D.Yu. Proprietors: Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego professional'nogo obrazovaniya "Samarskij gosudarstvennyj meditsinskij universitet". 6 p. (In Russ.)]
7. Попова Л.Л. Применение ронколейкина в противорецидивной терапии хронического вирусного гепатита С // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2007. № 5. С. 57–60. [Popova L.L. Use of roncoleukin in the antirecurrent therapy of chronic viral hepatitis C. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2007, no. 5, pp. 57–60. (In Russ.)]
8. Akbar S.M.F., Yoshida O., Hiasa Y. Immune therapies against chronic hepatitis B. *J. Gastroenterol.*, 2022, vol. 57, no. 8, pp. 517–528. doi: 10.1007/s00535-022-01890-8
9. Arasli M., Ustundag Y., Delikanli B., Harmandar F., Buyukuysal C. Peripheral blood lymphocyte dynamics and viral kinetics in patients with chronic active hepatitis B virus infection treated by tenofovir. *Hepatogastroenterology*, 2012, vol. 59, no. 115, pp. 851–857. doi: 10.5754/hge11580
10. Boni C., Laccabue D., Lampertico P., Giuberti T., Viganò M., Schivazappa S., Alfieri A., Pesci M., Gaeta G.B., Brancaccio G., Colombo M., Missale G., Ferrari C. Restored function of HBV-specific T cells after long-term effective therapy with nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology*, 2012, vol. 143, no. 4, pp. 963–973.e9. doi: 10.1053/j.gastro.2012.07.014
11. Czaja A.J. Exploring the pathogenic role and therapeutic implications of interleukin 2 in autoimmune hepatitis. *Dig. Dis. Sci.*, 2021, vol. 66, no. 8, pp. 2493–2512. doi: 10.1007/s10620-020-06562-2
12. Duan S.P., Zhu L.H., Hou L.J., Wang H.W., Zhu X.W., Hao J. [Effect of tenofovir disoproxil fumarate antiviral therapy on virus-specific CD8⁺ T cells function in patients with chronic hepatitis B]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2021, vol. 29, no. 5, pp. 421–426. (In Chinese). doi: 10.3760/cma.j.cn501113-20191113-00420
13. He J., Zhang R., Shao M., Zhao X., Miao M., Chen J., Liu J., Zhang X., Zhang X., Jin Y., Wang Y., Zhang S., Zhu L., Jacob A., Jia R., You X., Li X., Li C., Zhou Y., Yang Y., Ye H., Liu Y., Su Y., Shen N., Alexander J., Guo J., Ambrus J., Lin X., Yu D., Sun X., Li Z. Efficacy and safety of low-dose IL-2 in the treatment of systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.*, 2020, vol. 79, no. 1, pp. 141–149. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215396

14. Meng Z., Chen Y., Lu M. Advances in targeting the innate and adaptive immune systems to cure chronic hepatitis B virus infection. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 10: 3127. doi: 10.3389/fimmu.2019.03127
15. Mitra S., Leonard W.J. Biology of IL-2 and its therapeutic modulation: mechanisms and strategies. *J. Leukoc. Biol.*, 2018, vol. 103, no. 4, pp. 643–655. doi: 10.1002/JLB.2R10717-278R
16. Paccoud O., Surgers L., Lacombe K. Infection par le virus de l'hépatite B: histoire naturelle, manifestations cliniques et principes thérapeutiques. *Rev. Med. Interne.*, 2019, vol. 40, no. 9, pp. 590–598. doi: 10.1016/j.revmed.2019.03.333
17. Pal S., Dey D., Chakraborty B.C., Nandi M., Khatun M., Banerjee S., Santra A., Ghosh R., Ahammed S.M., Chowdhury A., Datta S. Diverse facets of MDSC in different phases of chronic HBV infection: impact on HBV-specific T-cell response and homing. *Hepatology*, 2022, vol. 76, no. 3, pp. 759–774. doi: 10.1002/hep.32331
18. Pang X., Zhang L., Liu N., Liu B., Chen Z., Li H., Chen M., Peng M., Ren H., Hu P. Combination of pegylated interferon-alpha and nucleos(t)ide analogue treatment enhances the activity of natural killer cells in nucleos(t)ide analogue experienced chronic hepatitis B patients. *Clin. Exp. Immunol.*, 2020, vol. 202, no. 1, pp. 80–92. doi: 10.1111/cei.13486
19. Qi W., Wang Y., Huang G., Wang K. Interleukin-2 promotes pegylated interferon alpha for hepatitis B surface antigen loss: a retrospective pragmatic clinical study at the Fourth Affiliated Hospital of Zhejiang University Medical College. *Health Sci. Rep.*, 2022, vol. 5, no. 6: e932. doi: 10.1002/hsr2.932
20. Rivino L., Le Bert N., Gill U.S., Kunasegaran K., Cheng Y., Tan D.Z., Becht E., Hansi N.K., Foster G.R., Su T.H., Tseng T.C., Lim S.G., Kao J.H., Newell E.W., Kennedy P.T., Bertoletti A. Hepatitis B virus-specific T cells associate with viral control upon nucleos(t)ide-analogue therapy discontinuation. *J. Clin. Invest.*, 2018, vol. 128, no. 2, pp. 668–681. doi: 10.1172/JCI92812
21. Shao M., He J., Zhang R., Zhang X., Yang Y., Li C., Liu X., Sun X., Li Z. Interleukin-2 deficiency associated with renal impairment in systemic lupus erythematosus. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2019, vol. 39, no. 2, pp. 117–124. doi: 10.1089/jir.2018.0016
22. Tülek N., Saglam S.K., Saglam M., Türkyilmaz R., Yildiz M. Soluble interleukin-2 receptor and interleukin-10 levels in patients with chronic hepatitis B infection. *Hepatogastroenterology*, 2000, vol. 47, no. 33, pp. 828–831.
23. Wang D., Fu B., Shen X., Guo C., Liu Y., Zhang J., Sun R., Ye Y., Li J., Tian Z., Wei H. Restoration of HBV-specific CD8⁺ T-cell responses by sequential low-dose IL-2 treatment in non-responder patients after IFN- α therapy. *Signal. Transduct. Target. Ther.*, 2021, vol. 6, no. 1: 376. doi: 10.1038/s41392-021-00776-0
24. Tsukuda S., Watashi K. Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral. Res.*, 2020, vol. 182: 104925. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104925
25. Wu D., Wang P., Han M., Chen Y., Chen X., Xia Q., Yan W., Wan X., Zhu C., Xie Q., Jiang J., Wei L., Tan D., Dou X., Yu Y., Hou J., Luo X., Ning Q. Sequential combination therapy with interferon, interleukin-2 and therapeutic vaccine in entecavir-suppressed chronic hepatitis B patients: the Endeavor study. *Hepatol. Int.*, 2019, vol. 13, no. 5, pp. 573–586. doi: 10.1007/s12072-019-09956-1
26. Wu J., Han M., Li J., Yang X., Yang D. Immunopathogenesis of HBV Infection. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2020, vol. 1179, pp. 71–107. doi: 10.1007/978-981-13-9151-4_4
27. Zhao F., Xie X., Tan X., Yu H., Tian M., Lv H., Qin C., Qi J., Zhu Q. The functions of hepatitis B virus encoding proteins: viral persistence and liver pathogenesis. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 691766. doi: 10.3389/fimmu.2021.691766
28. Zhu M.E., Wang Q., Zhou S., Wang B., Ke L., He P. Recombinant interleukin-2 stimulates lymphocyte recovery in patients with severe COVID-19. *Exp. Ther. Med.*, 2021, vol. 21, no. 3: 227. doi: 10.3892/etm.2021.9658
29. Zhu W., Liu H., Zhang X. Toward curative immunomodulation strategies for chronic hepatitis B virus infection. *ACS Infect. Dis.*, 2019, vol. 5, no. 5, pp. 703–712. doi: 10.1021/acinfecdis.8b00297

Авторы:

Новикова А.Ф., к.м.н., ассистент кафедры инфекционных болезней с эпидемиологией ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Попова Л.Л., д.м.н., профессор, профессор кафедры инфекционных болезней с эпидемиологией ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Константинов Д.Ю., д.м.н., доцент, зав. кафедрой инфекционных болезней с эпидемиологией ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия.

Authors:

Novikova A.F., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Infectious Diseases with Epidemiology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;

Popova L.L., DSc (Medicine), Professor, Professor of the Department of Infectious Diseases with Epidemiology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;

Konstantinov D.Yu., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of Department of Infectious Diseases with Epidemiology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation.

Поступила в редакцию 07.11.2022
Отправлена на доработку 26.02.2023
Принята к печати 05.12.2023

Received 07.11.2022
Revision received 26.02.2023
Accepted 05.12.2023

SIDE EFFECTS FOLLOWING ADMINISTRATION OF THE GAM-COVID-VAC IN MONTENEGRO

V. Dabanovic

Pharmacy Institution of Montenegro “Montefarm”, Podgorica, Montenegro

Abstract. Introduction. In Montenegro, vaccination against COVID-19 infection began with the use of Gam-COVID-Vac, which was not approved for emergency use before the end of clinical trials, by the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency. Therefore, it is necessary to emphasize the adverse effects. **Materials and methods.** For the purpose of this study, there were collected data from national adverse events reporting form for Gam-COVID-Vac obtained from the Health Institution Pharmacy of Montenegro — Montefarm, as the holder of permits for these vaccines. **Results.** For the period March 1, 2021 to February 13, 2022, after administration of 16 756 doses of vaccine Gam-COVID, a total of 220 case reports, or 716 adverse effects were recorded. The mean age of vaccinated individuals who reported adverse effects was 40.79±11.35 years. Totally, 79.55% females versus 20.45% males reported side effects post-vaccination. The most common adverse reaction was pyrexia (79.55%). Other very common adverse effects were as follows: injection site pain (38.18%), headache (33.18%), myalgia (32.27%), malaise (31.82%), fever (30.45%), arthralgia (22.73%) as well as swelling and redness at the site of application (15.91%). Less common adverse effects were nausea, pain in extremity, diarrhea, dizziness, fatigue, sore throat and labial herpes. Serious adverse effects were recorded in 8 cases including tinnitus, thrombophlebitis, hypotension, chest pain, palpitations and peripheral cyanosis related to specific comorbidities. **Conclusions.** After the administration of Gam-COVID vaccine, the population in Montenegro experienced mild to moderate adverse effects, with rare serious transient adverse effects related to specific comorbidities. The data presented here on investigating Gam-COVID-Vac vaccine verified good safety profile and high tolerability evidenced by the statistics analysis as lacked COVID-19-associated hospitalizations or deaths.

Key words: COVID-19, vaccination, Gam-COVID-Vac, adverse effects, comorbidities, safety.

ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ Гам-КОВИД-Вак В ЧЕРНОГОРИИ

Дабанович В.

Учреждение здравоохранения Аптеки Черногории «Монтефарм», Подгорица, Черногория

Резюме. Введение. В Черногории вакцинация против инфекции COVID-19 началась с использования Гам-КОВИД-Вак, который не был одобрен для экстренного использования до окончания клинических испытаний со стороны Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов и Европейского агентства по лекарственным средствам. Поэтому необходимо подчеркнуть побочные эффекты. **Материалы и методы.** Данные для целей настоящего исследования были собраны из национальной формы сообщения о нежелательных явлениях для Гам-КОВИД-Вак, полученной от Учреждения здравоохранения Аптеки Черногории — Монтефарм как носителя разрешения на эти вакцины. **Результаты.** За период с 1 марта 2021 г. по 13 февраля 2022 г. после применения 16 756 доз вакцины Gam-COVID было всего

Адрес для переписки:

Вера Дабанович
81000, Черногория, Подгорица, Булевар Светог Петра Цетињског, 87, Учреждения здравоохранения Аптеки Черногории «Монтефарм».
Тел.: 0038267646928.
E-mail: vera.dabanovic@montefarm.co.me

Contacts:

Vera Dabanovic
81000, Montenegro, Podgorica, Bulevar Svetog Petra Cetinjskog, 87,
Pharmacy Institution of Montenegro “Montefarm”.
Phone: 0038267646928.
E-mail: vera.dabanovic@montefarm.co.me

Для цитирования:

Дабанович В. Побочные эффекты при применении Гам-КОВИД-Вак в Черногории // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1150–1160.
doi: 10.15789/2220-7619-SEA-15628

Citation:

Dabanovic V. Side effects following administration of the Gam-COVID-Vac in Montenegro // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1150–1160. doi: 10.15789/2220-7619-SEA-15628

зарегистрировано 220 случаев, то есть 716 побочных эффектов. Средний возраст вакцинированных, сообщивших о нежелательных явлениях, составил $40,79 \pm 11,35$ лет. В общей сложности 79,55% женщин по сравнению с 20,45% мужчин сообщили о побочных эффектах после вакцинации. Наиболее частой побочной реакцией была температурная (79,55%). Другими очень частыми побочными эффектами были: боль в месте инъекции (38,18%), головная боль (33,18%), миалгия (32,27%), недомогание (31,82%), лихорадка (30,45%), артралгия (22,73%), отек и покраснение в месте введения (15,91%). Менее распространенными побочными эффектами были тошнота, боль в конечностях, диарея, головокружение, утомляемость, боль в горле и herpes labialis. Серьезные побочные эффекты — шум в ушах, тромбоз, гипотония, боль в груди, учащенное сердцебиение и периферический цианоз — были зафиксированы в 8 случаях. Все они были связаны с наличием сопутствующих заболеваний. **Выводы.** После введения вакцины Гам-КОВИД у населения Черногории наблюдались побочные эффекты легкой и средней степени тяжести с редкими серьезными эффектами преходящего характера, которые были связаны с определенными сопутствующими заболеваниями. По результатам данного исследования вакцина Гам-КОВИД подтвердила хороший профиль безопасности и высокую переносимость, о чем свидетельствует статистический анализ с отсутствием госпитализаций и летальных случаев.

Ключевые слова: COVID-19, вакцинация, Гам-КОВИД-Вак, побочные эффекты, сопутствующие заболевания, безопасность.

Introduction

SARS-CoV-2 virus infection, detected on December 31, 2019 in Wuhan (China), has rapidly widespread and caused a global pandemic of acute respiratory disease, defined as COVID-19 disease. A high rate of transmission and ability to mutate are the most distinctive characteristics of the SARS-CoV-2 virus, as indicated by data on registered cases of infection as well as the duration of the pandemic [9, 14]. From December 2019 until August 8, 2023 total of 695 063 811 cases of infection plus 6 913 777 deaths were registered globally. Accordingly, COVID-19 has been a public health problem worldwide [33].

The pandemic has forced policy makers, health professionals, pharmaceutical industry and other organizations, at the level of diagnostics (development of fast and reliable diagnostic methods), treatment (application of effective therapeutic options, use of existing and synthesis of new drugs) and prevention (introduction of preventive measures, recommendations for protection and vaccination) to decree urgent confinements to combat, stop a rapid and massive contagion and reduce COVID-19 mortality [2].

After identification of SARS-CoV-2 genome sequence, pharmaceutical companies have designed and developed considerable number of COVID-19 vaccines using either previously available vaccine production technologies or new scientific approaches and methods. By the end of 2020, more than 280 different COVID-19 vaccines were in some stages of development. In addition, according to the World Health Organization (WHO), 63 vaccines and more than 172 candidate vaccines were in preclinical development [6, 18]. Vaccines, along with all drugs, are subject to legal regulations for placing the drug on the market, which, among other things, involves providing documentary evidence of pharmaceutical-chemical-biological testing, pre-clinical or pharmacological-toxicological testing as well as clinical trials of drugs, which prove quality, efficacy and drug safety.

Assuming the urgent need to prevent the spread of COVID-19 infection plus the fact that the development of new drugs/vaccines is an enduring process (around 10 years), conventional procedures for approving the marketing of COVID-19 vaccines could not be followed. Nevertheless, the WHO and the European Medicines Agency (EMA), in public health emergencies, such as pandemics, may also authorize the use of certain medicines that do not comply with regulatory legal procedures for placing on the market if presented data indicate that the benefits outweigh the risks. Depending on the regulatory process for the evaluation and approval of vaccines, certain vaccines against COVID-19 in the clinical trial phase, received emergency use approval before the completion of all three phases of clinical trials [8, 10]. Therefore, this fact is of particular importance for collecting enough scientific evidence on adverse events (AE), recording, evaluating and monitoring the AE of the vaccinated population.

The first registered cases of SARS-CoV-2 virus infection in Montenegro were confirmed on March 17, 2020. By August 8, 2023, there were 292 510 infected and 2828 deaths cases (0.97%) as a result of COVID-19 infection. The vaccine that first arrived and with which the vaccination started in Montenegro on March 1, 2021, was Gam-COVID-Vac, produced by FSBI “NRCEM n.a. N.F. Gamaleya”, Russian Federation. The vaccine was developed as a vector vaccine. It is meant to be given as two doses (Gam-COVID-Vac component I and Gam-COVID-Vac component II) with different adenovirus-based viral vectors (serotypes 26 and 5) administered 21 days apart. Then other vaccines arrived continuously (chronological overview):

- March, 16, 2021 — Vero Cell, SARS-CoV-2 vacc manufacturer Beijing Institute of Biological Products Co., Beijing, China;
- March, 30, 2021 — AstraZeneca (Vaxzevria®) Vaccine, manufactured by AstraZeneca Nijmegen B.V., Netherlands;

- May, 4, 2021 — Comirnaty® Vaccine, manufactured by Pfizer BioNTech, Belgium;
- October, 29, 2021 — CoronaVac, COVID-19 Vaccine (Vero Cell) Inactivated (SINOVAC) manufactured by Sinovac Life Sciences Co., Beijing, China;
- January, 24, 2022 — COVID-19 Vaccine Moderna®, manufactured by Rovi Pharma Industrial Services, S.A., Spain.

Amongst all procured vaccines in Montenegro, WHO issued emergency use approval at the time only for Comirnaty®, Vaxzevria® and Moderna® vaccines. Vaccines from the Chinese manufacturer Beijing were approved almost two months after their use (May 7, 2021), while vaccines from the Russian Federation are still not approved for use. Nevertheless, based on the Law on Medicinal Products (“Official Gazette of Montenegro”, No. 080/20), Article 8, the Government of Montenegro in cases of emergencies and other special situations, takes measures to supply medicines and prescribes special procedures and conditions for granting approval for the procurement and sale of medicines [34].

According to the WHO, Gam-COVID vaccine used in Montenegro against COVID-19 infection was not approved for emergency use. Therefore, it is necessary to emphasize AEs, compare recorded AEs with those in the summary of product characteristics as well as with the results of clinical studies, and establish a possible association between AEs and premorbid background, which is the main goal of this study. The results of this study will provide useful information to vaccine recipients in terms of expected AEs in a specific population depending on individual characteristics such as age, sex, as well as existing medical conditions.

Materials and methods

Process of a comprehensive adverse drug reaction (ADR) monitoring and reporting in Montenegro is defined by the Rulebook on the Manner of Collecting of Data and Reporting and Monitoring AEs to Medicines for Use in Human Medicine (46/2014). According to this Rulebook, monitoring the safety of medicines in the market and detecting any changes in the benefits and risks of their application is done by establishing a pharmacovigilance system by two entities — license holders and the Institute of Medicines and Medical Devices of Montenegro (CInMED) [28]. CInMED is an independent, national regulatory authority in the field of medicines and medical devices, responsible for monitoring AEs in Montenegro. In order to exchange information in the field of pharmacovigilance, CInMED is in the partnership with WHO Safe Use Program and cooperates with its Uppsala Monitoring Center (UMC), the European Medicines Agency (EMA) and other professional and regulatory bodies in European Union and other countries.

Adverse events are reported in safety reports of individual cases of AEs (ICSR) in the form of a standardized international form (CIOMS I) for the ICSR report, issued in 1990 by CIOMS and the working group of the Council of International Organizations for Medical Sciences. The form includes information about the patient (age, sex), disease records, information on the details of adverse events (beginning, duration, severity, and outcome) and administrative details (source of the AE report and association with the vaccine received).

Every single report of adverse events by healthcare professionals, pharmaceutical companies and patients is forwarded by CInMED to the qualified person responsible for the pharmacovigilance of the marketing authorization holder, i.e. the importer/distributor, with the protection of the reporter’s data. The authority responsible for pharmacovigilance monitors the safety profile and all safety issues related to licensed vaccines and is obliged to forward the report of suspected AEs after vaccination to vaccine manufacturers in order to be included in global safety documents. Applications from CInMED are entered into the VigiFlow database, processed in such a way that the data on the suspected vaccine and the reactions expressed are coded using the MedDRA dictionary. VigiFlow supports data exchange of safety information with internal and external stakeholders in different formats such as Excel, xml/ICH E2B and provides secure, controlled and easy sharing of adverse event reports to WHO through VigiBase, WHO’s global database of reported potential side effects of medicinal products, EMA (EudraVigilance) and other systems such as DHIS2 and Vigilance Hub.

For the purpose of this study, we collected data from national adverse events reporting form for vaccines against COVID-19 infection — Gam-COVID component I and Gam-COVID component II. The data were obtained from the Health Institution Pharmacy of Montenegro Montefarm, as the holder of permits for these vaccines. All collected data were placed in appropriate files — DBF (data base file), inserted into Excel operating program and formed tables that for all analyzed vaccines contained age, sex, medical conditions, side effects, the relationship between side effects and vaccines and the source of application. The recorded AE are, in relation to the prevalence, expressed as a percentage and the obtained data are compared with the data from the approved summaries (Table 1) [29]. For other AE, an association with available study results was sought. Electronic databases — PubMed, Embase, Cochrane Library and Google Scholar — were searched using the descriptors “Gam-COVID”, “adverse effects” and “safety” in English, without time limit.

Data on the total number of vaccinated persons with the first, second and third dose of analyzed vaccines were collected from the electronic database of the Institute of Public Health of Montenegro, relying on the calculated percentage of reported AE to vaccines.

Table 1. Adverse effects Gam-COVID-Vac from the approved summaries

AE	Symptoms
General injection site disorders and reactions	Very common and common — hyperthermia
	Very common and common — injection site pain
	Very common and common — injection site swelling
	Very common and common — asthenia
	Very common and common — pain
	Very common and common — malaise
	Very common and common — pyrexia
	Very common and common — decreased appetite
Nervous system disorders	Common — nervous system disorders
	Rare — dizziness, syncope
Musculoskeletal disorders	Very common and common — arthralgia, myalgia
Respiratory, chest, and mediastinal disorders	Common — oropharyngeal pain, nasal congestion, sore throat, rhinorrhea
Gastrointestinal disorders	Common — nausea
	Common — vomit
	Common — dyspepsia
Lab test and instrumentation data	Divergent deviations of immunological status indicators
	– increased count of T-lymphocytes
	– increase in the percentage of lymphocytes
	– decreased count of natural killer cells
	– increased count of CD4-lymphocytes
	– decreased count of CD4-lymphocytes
	– increased count of B-lymphocytes
	– decreased count of B-lymphocytes
	– increased count of natural killer cells
	– increased count of CD8 lymphocytes
	– increased level of immunoglobulin E (IgE) in the blood
	– increase in the CD4/CD8 ratio
	– decrease in the CD4/CD8 ratio
	– increased level of immunoglobulin A (IgA) in the blood
	– decrease in the percentage of CD8 lymphocytes
	Abnormalities in the complete blood count
	– increase in the percentage of lymphocytes
	– decrease in the hematocrit
	– increased count of lymphocytes and monocytes
	– increase in the erythrocyte sedimentation rate
	– increased platelet count
– decreased count of neutrophils	
– decreased platelet count	
Deviations in common urine analysis	
– erythrocytes in the urine	

This study included all AEs reported to the import license holder, Montefarm, following the administration of any of the three doses Gam-COVID-Vac in the period between March 1, 2021 and February 13, 2022.

Results

For the period March 1, 2021 to February 13, 2022, a total of 8302 people had received Gam-COVID vaccine their first dose, 8,136 the second doses and 318 the third dose. Gam-COVID-Vac component I was used as the first and third dose and Gam-COVID-Vac component II as the second dose. In the mentioned period,

a total of 16 756 doses of Gam-COVID vaccine were administered, namely 8620 Gam-COVID-Vac component I and 8136 Gam-COVID-Vac component II.

98% of vaccinated with the first dose also received the second dose though only 3.9% of the population received the third dose. Public Health Institute recommended mRNA vaccines as the third dose, for reasons of well-documented immunity, especially in persons over 60 years of age which resulted in small coverage with the third dose of the Gam-COVID-Vac. As for the age structure of the vaccinated, the largest percentage of the vaccinated population was in older than 50 years of age (65.9%) (Fig. 1).

Table 2. Demographic characteristics of individuals vaccinated with Gam-COVID-Vac (component I and component II) with reported AE

Age	Gam-COVID-Vac I dose		Gam-COVID-Vac II dose		Total	
	Reported cases (n)	Percentage (%)	Reported cases (n)	Percentage (%)	Reported cases (n)	Percentage (%)
20–30	35	19.02	8	22.22	43	19.55
31–40	63	34.24	13	36.11	76	34.55
41–50	48	26.09	5	13.89	53	24.09
51–60	32	17.39	8	22.22	40	18.18
61–70	4	2.17	2	5.56	6	2.73
71–80	0	0.00	0	0.00	0	0.00
81–90	2	1.09	0	0.00	2	0.91
Total	184	100.00	36	100.00	220	100.00
Average value±SD	40.85±11.26		40.44±11.97		40.79±11.35	
Min–max	21–81		22–65		21–81	
Gender						
Male	37	20.11	6	16.67	45	20.45
Female	147	79.89	30	83.33	175	79.55

After receiving of 16 756 doses of vaccine Gam — COVID, a total of 220 case reports, or 716 AE, were reported, equivalent to a reporting rate of 13,1 case reports and 42,7 AE per 1000 doses received. Out of 220 reports of AE, 184 related to Gam-COVID-Vac component I, and 36 to Gam-COVID-Vac component II. The mean age of vaccinated individuals who reported AE was 40.79±11.35 ranged between 21 and 81 years with a median of 39 (Fig. 1). Statistically significant gender difference in the percentage was reported, 20,45% in males vs 79,55% in females (Table 2).

Of the total number of individuals (220) who reported AEs, 8.64% (n = 19) had at least one medical condition recorded in the CIOMS form. The most common condition was hypertension (3.18%, n = 7), followed by myocardial infarction (1.36, n = 3), obesity (1.36%, n = 3), thyroid disorder (0.91%, n = 2), thrombophilia (0.91).%, n = 2) and thrombophlebitis (0.91%, n = 2). Among other medical conditions, insulin resistance (0.45%, n = 1), obstructive chronic bronchitis (0.45%, n = 1), lupus (0.45%, n = 1), angio-

na pectoris (0.45%, n = 1), and one person had multiple comorbidities — overlap autoimmune hepatitis/primary biliary cirrhosis, Sjogren’s syndrome, celiac disease and chronic gastritis.

Case reports were submitted by health professionals, 219 from doctors and one from a pharmacist. The biggest number of applications refers to the population under 60 years of age (96.4%) (Fig. 2).

Local and systemic AE after Gam-COVID-Vac component I and Gam-COVID-Vac component II are presented in Table 3. The most common adverse reaction was pyrexia reported with 175 of vaccinated individuals (79.55%). The range in body temperature was 37.1 to 40°C and most often occurred 8–12 hours after vaccination. The estimated median total duration of pyrexia was 1 to 36 hours. Other very common AE were: injection site pain (38.18%), headache (33.18%), myalgia (32.27%), malaise (31.82%), fever (30.45%), arthralgia (22.73%) and swelling and redness at the site of application (15.91%). Less common AE after administration of these vaccines were

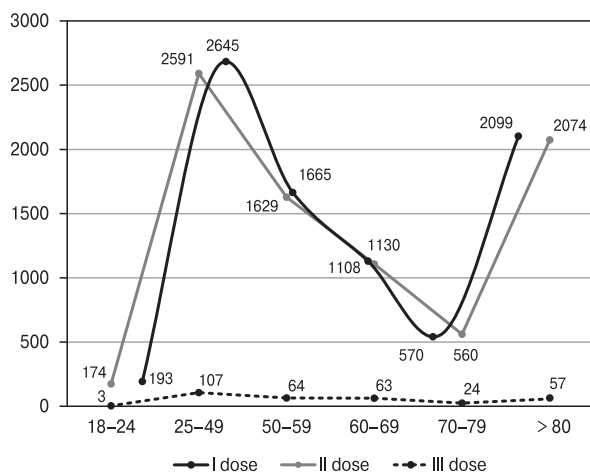


Figure 1. Age structure of those vaccinated with the first, second and third dose of Gam-COVID-Vac

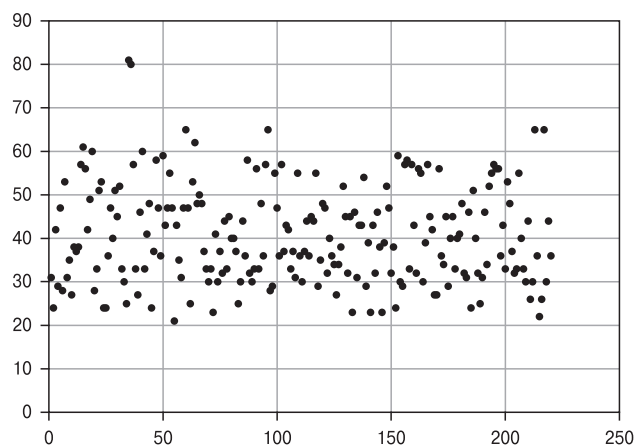


Figure 2. Age distribution of the study sample of AE to Gam-COVID-Vac in Montenegro

Table 3. Local and systemic AE Gam-COVID-Vac component I and component II

AE	Gam-COVID component I (n = 184)	Gam-COVID component II (n = 36)	Total	
	Number and percentage, n (%)	Number and percentage, n (%)	N = 220	%
Local adverse events				
Injection site pain	67 (36.41)	17 (47.22)	84	38.18
Injection site swelling, erythema	31 (16.85)	4 (11.11)	35	15.91
Systemic adverse events				
Pyrexia	153 (83.15)	22 (61.11)	175	79.55
Headache	59 (32.07)	14 (38.89)	73	33.18
Fatigue	7 (3.80)	1 (2.78)	8	3.64
Malaise	56 (30.43)	14 (38.89)	70	31.82
Myalgia	57 (30.98)	14 (38.89)	71	32.27
Fever	52 (28.26)	15 (41.67)	67	30.45
Arthralgia	44 (23.91)	6 (16.67)	50	22.73
Nausea	16 (8.7)	3 (8.33)	19	8.64
Pain in extremity	14 (7.61)	2 (5.56)	16	7.27
Diarrhoea	8 (4.35)	2 (5.56)	10	4.55
Dizziness	7 (3.80)	2 (5.56)	9	4.09
Oropharyngeal pain	2 (1.09)	2 (5.56)	4	1.82
Herpes simplex	3 (1.63)	–	3	1.36
Tinnitus	2 (1.09)	–	2	0.91
Thrombophlebitis	2 (1.09)	–	2	0.91
Hypotension	1 (0.54)	1 (2.78)	2	0.91
Chest pain	1 (0.54)	1 (2.78)	2	0.91
Paresthesia	2 (1.09)	–	2	0.91
Cough	1 (0.54)	–	1	0.45
Dysphonia	1 (0.54)	–	1	0.45
Neutropenia	1 (0.54)	–	1	0.45
Dyspnoea	1 (0.54)	–	1	0.45
Palpitations	–	1 (2.78)	1	0.45
Metallic taste	1 (0.54)	–	1	0.45
Peripheral cyanosis	1 (0.54)	–	1	0.45
Nasaloedema	1 (0.54)	–	1	0.45
Face swelling	1 (0.54)	–	1	0.45
Feeling of heaviness	1 (0.54)	–	1	0.45
Lymphadenopathy	–	1 (2.78)	1	0.45
Renal pain	–	1 (2.78)	1	0.45

nausea (8.64%), pain in extremity (7.27%), diarrhea (4.55%), dizziness (4.09%), fatigue (3.64%), sore throat (1.82%) and herpes labialis (1.36%).

Rarely reported AE, recorded in one or two vaccines included paresthesia (tongue, lips and face), cough, hoarseness, neutropenia, bronchospasm, metallic taste in the mouth, swelling of the nasal mucosa, face and neck, heaviness in the body, supraclavicular lymphadenopathy and renal pain.

Among rare AE, serious AE were recorded in 8 cases including tinnitus, thrombophlebitis, hypotension, chest pain, palpitations and peripheral cyanosis.

Very common AE were in a significantly higher percentage of population younger than 50 years of age (pyrexia 87% vs 52%, fatigue 36% vs 17%, arthralgia 27% vs 8%) while dizziness, pain in extremity and gastrointestinal discomfort (nausea, diarrhea) were

more common in the population older than 50 years of age. Local AE were lower in males and systemic reactions of pyrexia (86% vs 53%) and headaches (37% vs 18%) were much more common in females, while other AE were similar (Fig. 3 and 4).

The difference in reported AE after the application of Gam Covid Vacc component I and component II mainly included rare effects, and of the frequent AE, higher temperature appeared in a significantly higher percentage after the application of the first dose (Gam-COVID-Vac component I). However, pyrexia and fever were reported in a higher percentage after the application of the second dose. AE such as skin reactions at the application site and arthralgia were lower after the second dose, while site pain, headache, malaise and myalgia were more common after Gam-COVID-Vac component II administration (Fig. 5).

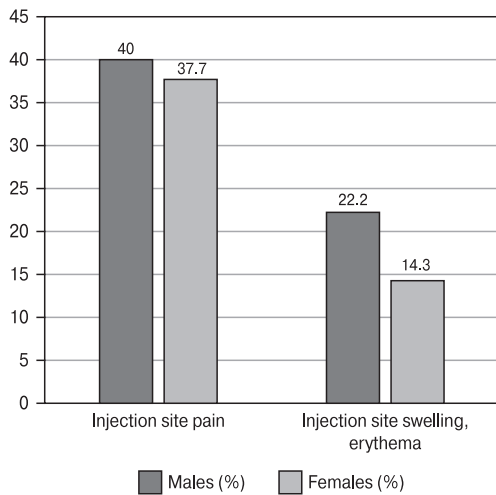


Figure 3. Sex group-graded the most common systemic vaccination reactions

Discussion

Based on the experience with the COVID infection, we are aware that vaccines are the most effective means of achieving control over the pandemic. Given the pandemic circumstances of the COVID infection, the urgent actions for vaccine synthesis, the short time frame for efficacy and safety testing, and their urgent approval for use before the completion of all three phases of clinical trials, there are public concerns about the efficacy and safety of vaccines against the COVID infection. Of particular importance is the dataset related to vaccines that for some reason have not yet been approved by the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency. Therefore, it is necessary to collect evidence-based information on the effectiveness and safety of vaccines. In terms of efficacy, the highest clinically confirmed efficacy (> 90%) against COVID infection, in preventing symptoms and reducing the risk of severe forms of COVID and death [11], was shown by mRNA vaccines, BNT162b2 Comirnaty® (~95%) and

mRNA-1273 Moderna (~94%) and adenovirus vaccine Gam-COVID-Vac (~92%) [7]. However, AEs play a key role in public confidence in vaccination.

The first vaccine against COVID infection that was administered in Montenegro was Gam-COVID. According to the recommendations of the National Immunization Advisory Body of Montenegro, health professionals (who came into contact with infected persons and their contacts), along with the elderly and those with chronic diseases had priority for the administration of the first limited quantities of vaccines. Accordingly, most health workers were vaccinated with Gam-COVID vaccine. The high rate of reports (13.1/1000 doses) and reported AE to Gam-COVID vaccine (42.7/1000 doses) is the result of professional responsibility and self-developed awareness of health professionals about the importance of the vaccines safety monitoring. These data are in agreement with the results of studies where the rate of reporting AE after vaccination of health care workers is higher [4, 26] compared to the rate of reporting AE after vaccination of general population [1].

According to the results of this study, a significantly higher number of AE reports were related to women compared to men (80.45% vs 19.55%), which is in line with the results of observational studies on AE, in general, for all vaccines against COVID infections [4, 23, 26].

Regarding age, AE were significantly more common in young people than in older adults, as found in other studies. The old population was vaccinated with the first vaccine, Gam-COVID vaccine as a high risk group. Out of the total number of administered doses (16 756 doses), 45.9% of the population over 60 years of age (7725 people) received the vaccine and only 3.6% (8 people) reported AE; 3.3% after the first dose and 5.5% after the second dose. According to a study by Montalti et al. [24] 43.7% population aged 60 and over reported AE after the first dose of Gam-COVID vaccine plus 60% after the second dose which is not in agreement with these results.

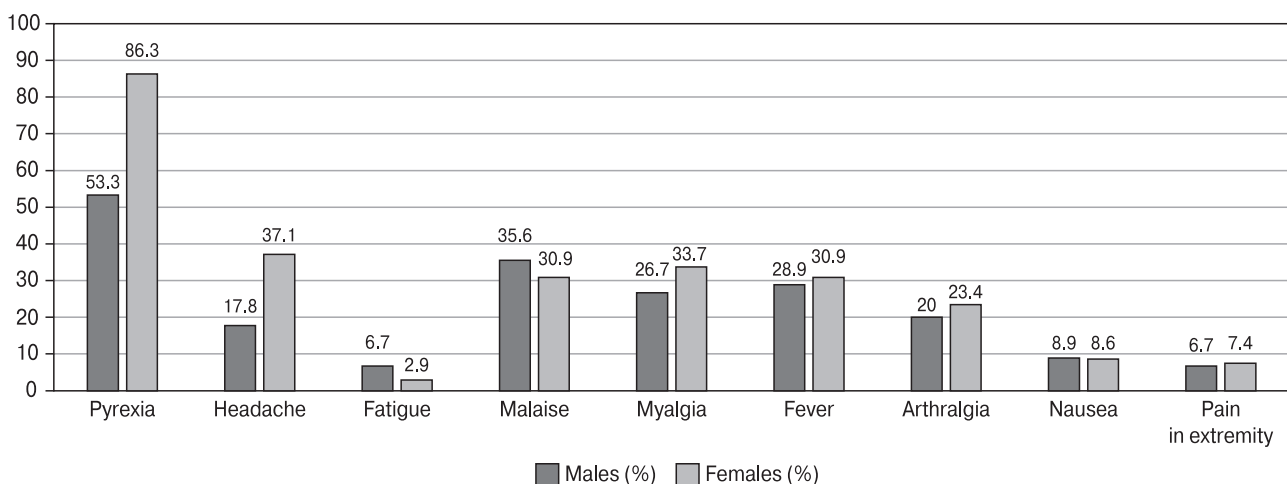


Figure 4. Sex group-graded the most common systemic vaccination reactions

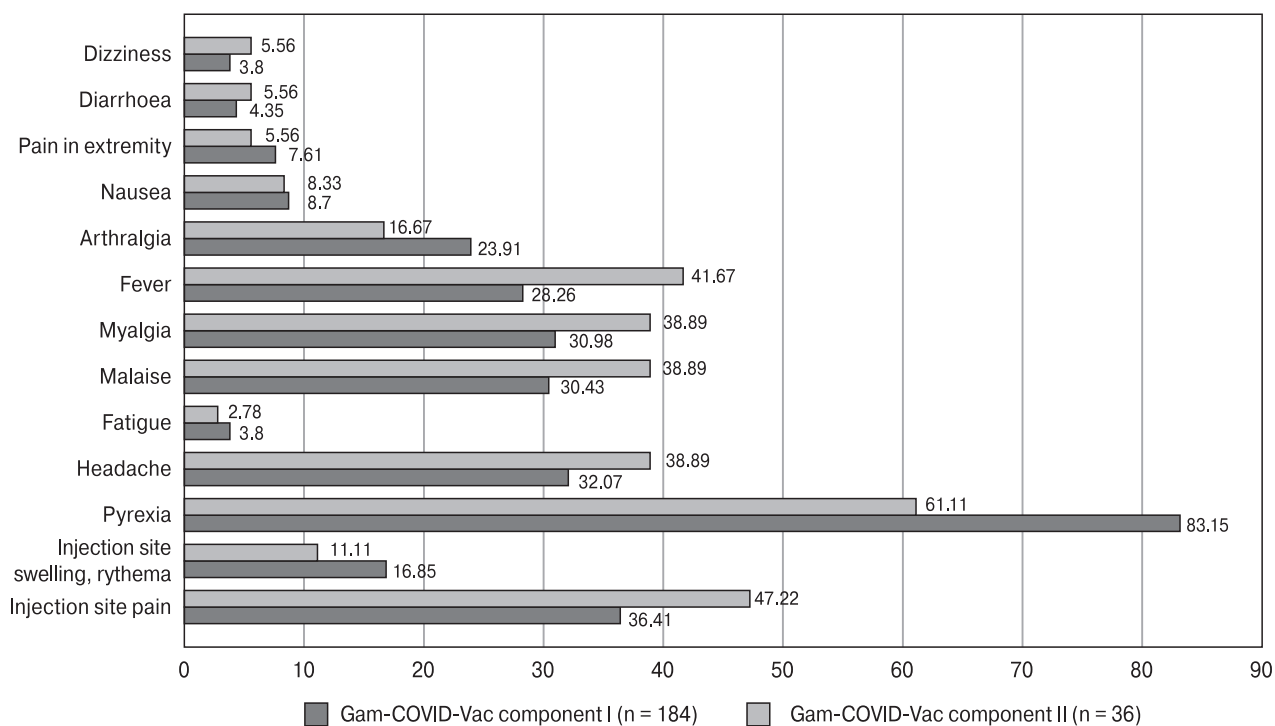


Figure 5. AE of Gam-COVID-Vac component I, and Gam-COVID-Vac component II

Difference can be explained by a significantly higher percentage of vaccinated persons 60 years of age and older (76.1%) compared to the same age population of this study (45.9%).

Regarding AE after the first and second doses of Gam-COVID vaccine, the results are controversial. In the observational study by Montalti et al. [24], side effects increased after the second dose and in the study by Babamahmoodi et al. [4], side effects significantly decreased after the second dose compared to the first. In this study, a much higher number of reports were related to the first dose compared to the second dose (5.1% vs 1%) but the number of side effects in relation to the number of reports was slightly higher after the second dose received (3.4% vs 3.2%). This variability in results may be due to the different Gam-COVID-Vac component I and Gam-COVID-Vac component II vectors.

The most common AE in this study included pyrexia, fever, application site reactions, headache, musculoskeletal pain, general weakness (fatigue and tiredness), consistent with the data collection and the results of a randomized controlled trial of phase 3 efficacy and safety Gam-COVID vaccine [21], in which the most common AE included influenza-like condition, application reaction, headache and asthenia. The frequency of AE, such as — injection site reaction, headache, fever, arthralgia, nausea, diarrhea, in this study is similar to the results of a study on AE after Gam-COVID vaccine in healthcare workers in Iran [4].

The emphasis of the study was placed on AEs not recorded in the summary of characteristics of the Gam-COVID-Vac, with a special focus on AEs that occurred in persons with present comorbidities,

in order to determine whether there is an association of AEs with a pre-morbid background.

The recorded AEs in this study, which are not found in the summary of characteristics, and characterized as rare and serious, occurred in the largest percentage as a consequence of the medical conditions of the participants.

Obesity is a serious health concern that increases the risk of many other health conditions. In this study, specific AEs were recorded in three subjects who had an increased body mass index. The primarily observed swelling of the face and neck, recorded in a woman (37 years old, BMI 28.16), was found to be lymphedema. Enlargement of lymph nodes is one of the possible reactions after vaccination, which was somewhat more pronounced in this person due to being overweight, as a significant risk factor for the development of lymphedema. Enlargement of lymph nodes is one of the possible reactions after vaccination, which was somewhat more pronounced in this person due to being overweight, as a significant risk factor for the development of lymphedema [22]. Kidney pain that manifested itself 12 hours after the administration of the second dose of the vaccine and lasted 24 hours, in a 22-year-old man with a BMI of 31.79, the doctor registered the link with the vaccine as “probable”. This condition is probably a consequence of obesity, as one of the most significant risk factors for kidney disease is a high body mass index [17]. An obese man (43 years old, BMI 32.22) developed herpes labialis, which the doctor did not associate with the vaccine. Research indicates a connection between obesity and herpes simplex virus infection [13], that fat tissue can participate in the body’s immune responses [15].

After administration of the first dose of Gam-COVID-Vac, thrombosis was recorded in two women, aged 56 and 65 years. Both women had thrombophlebitis in their medical history with other comorbidities (a 65-year-old woman had hypertension, and a 56-year-old woman had hypertension and thyrotoxicosis). Thrombosis was reported in three cases in the phase 3 study [21], two cases in the vaccine group and one case in the placebo group. Research results indicate that a possible cause of thrombosis in vector vaccines is an immune response to the vector, which leads to heparin-induced thrombocytopenia, which leads to the formation of antibodies directed against the complex of platelet factor 4 with heparin [12]. However, in this study, the reporters do not link the manifested reaction to the vaccine, precisely because of thrombophlebitis as a registered medical condition in the medical history of these two patients. That hypertension and thyroid disorders do not affect thrombophlebitis is confirmed by cases that had these medical conditions and only mild, common effects from AE.

More serious adverse reactions after vaccination with the first and second doses of Gam-COVID-Vac were noted in a 44-year-old woman with multiple comorbidities — overlap autoimmune hepatitis/primary biliary cirrhosis, Sjogren's syndrome, celiac disease, and chronic gastritis. After the first dose, the more serious AEs included tinnitus and hypotension, resulting in collapse, and after the second dose, palpitations and hypotension, lasting 48 hours. Studies indicate that Sjogren's syndrome can develop hyper orthostatic hypotension [30], vestibular symptoms, such as dizziness and tinnitus [25] as well as autonomic nervous system dysfunction that affects the cardiovascular system [16]. But it is not known if the vaccine temporarily "enhanced" this medical condition or if it interacted with the therapy, because the patient with another autoimmune disease, lupus, had only a slightly elevated temperature (37.3°C) from AE. Given that the patient had several comorbidities, it is assumed that she was also taking a large number of medications that the doctor did not list in the formulary.

Other patients included in this study, who had a history of serious medical conditions — insulin resistance, chronic obstructive bronchitis, myocardial infarction and thrombophilia, had the expected and short-term AEs (pyrexia, fever, pain at the application site) in a milder form.

Tinnitus, which was reported by another female case after the administration of the first dose of Gam-COVID-Vac has not been reported in studies with this type of vaccine. Cases of tinnitus after administration of vector-based vaccines (Vaxzevria®) and mRNA (Comirnaty®) have been reported in the literature [27, 32]. However, during the last two years, the number of people who developed tinnitus after vaccination has been increasing. The mechanism of tinnitus formation is still unknown it is possible that it occurs as a conse-

quence of a hypersensitivity reaction with an abnormal autoimmune response or vasculitis [27]. Also, study results indicate that the vaccine interacts with pre-existing risk factors for tinnitus and that there is a link between glaucoma and tinnitus, with glaucoma patients having a 19% higher chance of developing tinnitus [3]. A report of a metallic taste (which was present for 21 days), accompanied by chest pain, pyrexia, fever, gastrointestinal complaints and myalgia in a 33-year-old woman was submitted by a doctor with the comment that the person was probably infected with a COVID infection during the period when she was vaccinated.

Peripheral cyanosis of the fingers appeared 9 hours after vaccination and lasted half an hour, in a 51-year-old woman with no history of Raynaud's phenomenon. There have been cases in the literature in which Raynaud's phenomenon occurred after m-RNA-based COVID vaccines (BNT162b2-Comirnaty® and mRNA-1273-Spicevax®) and adenovirus vaccines (Vaxzevria®). The link between COVID vaccines and cyanosis has not yet been clarified, because the occurrence of Raynaud's phenomenon has also been reported after vaccination against human papillomavirus, hepatitis B and diphtheria-tetanus. But the authors point to the possibility that the spike protein may act as an additional trigger in the development of Raynaud's phenomenon [20].

Mild chest pain, which lasted 1 hour, accompanied by fever and malaise also occurred in a 51-year-old woman after the second dose. This short-term pain can be psychological in nature.

Oral paresthesias, especially of a short-term, transient nature, as described in this study where two cases of paresthesia lasting 1 minute were recorded, are most often the result of psychogenic disorders (fear, anxiety, depression,...) [5].

In this study, reported adverse effects were mild or moderate, and no serious AEs considered vaccine-related were reported, which is consistent with the results of observational and survey studies with low sample size. Recorded serious AEs were not related to the vaccine but to comorbidities. Medical conditions that require caution and monitoring of the patient after vaccination are obesity, thrombophlebitis and Sjogren's syndrome. It is safe to use Gam-COVID-Vac in patients with lupus, hypertension, thrombophilia, insulin resistance, chronic obstructive bronchitis and thyrotoxicosis.

Although it still does not have approval for use by the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency, compared to other approved vaccines against COVID infection, Gam-COVID-Vac has a much lower rate and incidence of AEs. It belongs to one of the three most effective vaccines, with the difference that highly effective mRNA vaccines lead to rare but very serious clinical manifestations such as acute myocardial infarction, Bell's palsy, cerebral venous sinus thrombosis, Guillain-Barré syndrome, myocarditis/pericarditis, pulmonary embolism, stroke,

thrombosis with thrombocytopenia syndrome, lymphadenopathy, appendicitis, herpes zoster reactivation, neurological complications, and autoimmunity (e.g., autoimmune hepatitis and autoimmune peripheral neuropathies) [31]. In order to improve future vaccines, studies are being conducted that try to clarify the mechanisms of the occurrence of side effects after the administration of vaccines against COVID infection. The results of these studies will provide evidence as to whether there is a clear association between these effects and vaccines and, if so, which vaccine components and/or platforms are responsible for these reactions [19].

Conclusion

According to the results of this study, Gam-COVID-Vac confirmed a good safety profile and high tolerability, as indicated by the statistics that there were no hospitalizations and no deaths. After administration of the Gam-COVID vaccine, the population in Montenegro had mild to moderate AEs, with rare serious AEs of a transient nature, which were associated with certain comorbidities. The most common side effects were in accordance with the data from the summary of drug characteristics and the results of the randomized controlled trial phase 3 trials. These included fever, site reaction, headache and musculoskeletal pain. The most important variables in the prevalence of AEs were age, sex, and premorbid background.

AEs were significantly more frequent in women and the younger population and slightly more pronounced in patients with certain medical conditions.

Future studies on the safety of the Gam-COVID vaccine should focus on the population with comorbidities, who have an increased risk of infection with COVID-19, in order to prove whether there is an association of the vaccine with adverse effects or with a premorbid background and reliably assess and prevent risk of AEs.

Vaccination is the most effective form of protection against COVID-19 and should be continued to reduce the risk of severe infection and death. Rapid identification of potential health risks and effective measures to reduce them is the basis for restoring, gaining and strengthening the general population's trust in vaccination. That is why support, improvement and strengthening of the pharmacovigilance as well as cooperation at the global level are necessary.

Limitation of the study

This study is limited by the small sample size and insufficiently complete data from the CIOMS form (therapy, comorbidities).

Acknowledgments

Thanks to all the doctors who professionally and quickly sent detailed reports on adverse events.

References

- Adverse Events Following Immunization for COVID-19 Vaccines in Lebanon. COVID-19 Vaccines – Lebanon. URL: <https://www.moph.gov.lb/userfiles/files/Quality%26Safety/PharmacovigilanceSystemInLebanon/Pharmacovigilance%20Report%20%23%204.pdf> (18.08.2023)
- Aghamirza Moghim Aliabadi H., Eivazzadeh-Keihan R., Beig Parikhani A., Fattahi Mehraban S., Maleki A., Fereshteh S., Bazaz M., Zolriasatein A., Bozorgnia B., Rahmati S., Saberi F., Yousefi Najafabadi Z., Damough S., Mohseni S., Salehzadeh H., Khakyzadeh V., Madanchi H., Kardar G.A., Zarrintaj P., Saeb M.R., Mozafari M. COVID-19: a systematic review and update on prevention, diagnosis, and treatment. *MedComm. (2020), 2022, vol. 3, no. 1: e115. doi: 10.1002/mco2.115*
- Ahmed S.H., Waseem S., Shaikh T.G., Qadir N.A., Siddiqui S.A., Ullah I., Waris A., Yousaf Z. SARS-CoV-2 vaccine-associated-tinnitus: a review. *Ann. Med. Surg. (Lond.), 2022, vol. 75: 103293. doi: 10.1016/j.amsu.2022.103293*
- Babamahmoodi F., Saeedi M., Alizadeh-Navaei R., Hedayatzadeh-Omran A., Mousavi S.A., Ovaise G., Kordi S., Akbari Z., Azordeh M., Ahangarkani F., Alikhani A. Side effects and immunogenicity following administration of the Sputnik V COVID-19 vaccine in health care workers in Iran. *Sci. Rep., 2021, vol. 11, no. 1: 21464. doi: 10.1038/s41598-021-00963-7*
- Bhatia M.S., Bhatia N.K., Bhatia N.K. Psychogenic lingual paresthesia. *J. Clin. Diagn. Res., 2015, vol. 9, no. 5, pp. VD04–VD05. doi: 10.7860/JCDR/2015/11916.5897*
- Bok K., Sitar S., Graham B.S., Mascola J.R. Accelerated COVID-19 vaccine development: milestones, lessons, and prospects. *Immunity, 2021, vol. 54, no. 8, pp. 1636–1651. doi: 10.1016/j.immuni.2021.07.017*
- Chirico F., Teixeira da Silva J.A., Tsigaris P., Sharun K. Safety & effectiveness of COVID-19 vaccines: a narrative review. *Indian. J. Med. Res., 2022, vol. 155, no. 1, pp. 91–104. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_474_21*
- Conditional marketing authorization. European Medicines Agency. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/marketing-authorisation/conditional-marketing-authorisation> (13.08.2023)
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol., 2020, vol. 5, no. 4, pp. 536–544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z*
- Emergency Use Authorization. Food and Drug Administration. URL: <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-legal-regulatory-and-policy-framework/emergency-use-authorization> (13.08.2023)
- Fiolet T., Kherabi Y., MacDonald C.J., Ghosn J., Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin. Microbiol. Infect., 2022, vol. 28, no. 2, pp. 202–221. doi: 10.1016/j.cmi.2021.10.005*
- Gupta A., Sardar P., Cash M.E., Milani R.V., Lavie C.J. Covid-19 vaccine-induced thrombosis and thrombocytopenia—a commentary on an important and practical clinical dilemma. *Prog. Cardiovasc. Dis., 2021, vol. 67, pp. 105–107. doi: 10.1016/j.pcad.2021.05.001*

13. Hsu C.J., Hung J.H., Lin I.H., Tseng S.H., Lin S.H., Huang Y.H. Overweight and obesity as risk factors for recurrent herpetic stromal keratitis during long-term antiviral prophylaxis. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 12: 2812. doi: 10.3390/v14122812
14. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10223, pp. 497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
15. Karjala Z., Neal D., Rohrer J. Association between HSV1 seropositivity and obesity: data from the National Health and Nutritional Examination Survey, 2007–2008. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 5: e19092. doi: 10.1371/journal.pone.0019092
16. Kovács L., Paprika D., Tákacs R., Kardos A., Várkonyi T.T., Lengyel C., Kovács A., Rudas L., Pokorny G. Cardiovascular autonomic dysfunction in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 2004, vol. 43, no. 1, pp. 95–99. doi: 10.1093/rheumatology/keg468
17. Kovesdy C.P., Furth S.L., Zoccali C.; World Kidney Day Steering Committee. Obesity and kidney disease: hidden consequences of the epidemic. *J. Nephrol.*, 2017, vol. 30, no. 1, pp. 1–10. doi: 10.1007/s40620-017-0377-y
18. Kyriakidis N.C., López-Cortés A., González E.V., Grimaldos A.B., Prado E.O. SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. *NPJ Vaccines*, 2021, vol. 6, no. 1: 28. doi: 10.1038/s41541-021-00292-w
19. Lamprinou M., Sachinidis A., Stamoula E., Vavilis T., Papazisis G. COVID-19 vaccines adverse events: potential molecular mechanisms. *Immunol. Res.*, 2023, vol. 71, no. 3, pp. 356–372. doi: 10.1007/s12026-023-09357-5
20. Lisy M., Urban N., Brunner-Ziegler S., Weber B., Bauer W.M., Dassler E., Koppensteiner R., Handisurya A. Temporal association between COVID-19 vaccination and Raynaud's phenomenon: a case series. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2023, vol. 19, no. 1: 2199653. doi: 10.1080/21645515.2023.2199653
21. 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., Esmagametov 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
22. Mehrara B.J., Greene A.K. Lymphedema and obesity: is there a link? *Plast. Reconstr. Surg.*, 2014, vol. 134, no. 1, pp. 154e–160e. doi: 10.1097/PRS.0000000000000268
23. Menni C., Klaser K., May A., Polidori L., Capdevila J., Louca P., Sudre C.H., Nguyen L.H., Drew D.A., Merino J., Hu C., Selvachandran S., Antonelli M., Murray B., Canas L.S., Molteni E., Graham M.S., Modat M., Joshi A.D., Mangino M., Hammers A., Goodman A.L., Chan A.T., Wolf J., Steves C.J., Valdes A.M., Ourselin S., Spector T.D. Vaccine side-effects and SARS-CoV-2 infection after vaccination in users of the COVID Symptom Study app in the UK: a prospective observational study. *Lancet Infect. Dis.*, 2021, vol. 21, no. 7, pp. 939–949. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00224-3
24. Montalti M., Soldà G., Di Valerio Z., Salussolia A., Lenzi J., Forcellini M., Barvas E., Guttmann S., Messina R., Poluzzi E., Raschi E., Riccardi R., Fantini M.P., La Fauci G., Gori D.; San Marino Republic COVID ROCCA Group. ROCCA observational study: Early results on safety of Sputnik V vaccine (Gam-COVID-Vac) in the Republic of San Marino using active surveillance. *EClinicalMedicine*, 2021, vol. 38: 101027. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101027
25. Okawa Y., Ihara K. Sensorineural Hearing Loss in Sjögren's Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 19: 11181. doi: 10.3390/ijms231911181
26. Pagotto V., Ferloni A., Mercedes Soriano M., Díaz M., Braguinsky Golde N., González M.I., Asprea V., Staneloni M.I., Zingoni P., Vidal G., Aliperti V., Michelangelo H., Figar S. Active monitoring of early safety of Sputnik V vaccine in Buenos Aires, Argentina. *Medicina (B. Aires)*, 2021, vol. 81, no. 3, pp. 408–414.
27. Parrino D., Frosolini A., Gallo C., De Siatì R.D., Spinato G., de Filippis C. Tinnitus following COVID-19 vaccination: report of three cases. *Int. J. Audiol.*, 2022, vol. 61, no. 6, pp. 526–529. doi: 10.1080/14992027.2021.1931969
28. Pravilnik o načinu prikupljanja podataka i prijavljivanja i procjena neželjenih reakcija na lijekove za upotrebu u humanoj medicine. "Službeni list CG", br. 56/11 i 6/13. 2015 December. URL: <https://www.gov.me/dokumenta/9de59daf-b79f-4a4b-ab7a-7f305c3b-7c2d> (14.04.2023)
29. SPC Sputnik V (Gam-COVID vacc). URL: <https://cdsco.gov.in/opencms/resources/UploadCDSCOWeb/2018/UploadSmPC/SMPCsputnikdr.Reddys.pdf> (18.04.2023)
30. Takahashi J., Umehara T., Mitsumura H., Murakami H., Iguchi Y. Hyperadrenergic orthostatic hypotension with pure peripheral sympathetic denervation associated with Sjogren's syndrome. *Cureus*, 2021, vol. 13, no. 9: e17805. doi: 10.7759/cureus.17805
31. Trougakos I.P., Terpos E., Alexopoulos H., Politou M., Paraskevis D., Scorilas A., Kastiritis E., Andreakos E., Dimopoulos M.A. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis. *Trends Mol. Med.*, 2022, vol. 28, no. 7, pp. 542–554. doi: 10.1016/j.molmed.2022.04.007
32. Tseng P.T., Chen T.Y., Sun Y.S., Chen Y.W., Chen J.J. The reversible tinnitus and cochleopathy followed first-dose AstraZeneca COVID-19 vaccination. *QJM*, 2021, vol. 114, no. 9, pp. 663–664. doi: 10.1093/qjmed/hcab210
33. Worldometers. COVID-19 coronavirus pandemic. URL: <https://www.worldometers.info/coronavirus/> (Accessed: 08.08.2023)
34. Zakon o lijekovima. "Službeni list Crne Gore", br. 080/20 od 04.08.2020. URL: <https://www.katalogpropisa.me/wp-content/uploads/2020/11/050-Zakon-o-lijekovima-Odlomak.pdf> (16.08.2023)

Автор:

Дабанович В., д.м.н., Учреждения здравоохранения Аптеки Черногории «Монтефарм», Подгорица, Черногория.

Поступила в редакцию 19.08.2023
Отправлена на доработку 08.09.2023
Принята к печати 27.10.2023

Author:

Dabanovic V., DSc (Medicine), Pharmacy Institution of Montenegro "Montefarm" Podgorica, Montenegro.

Received 19.08.2023
Revision received 08.09.2023
Accepted 27.10.2023

EFFECT THE PRE-EXPOSURE PROPHYLACTIC OF HYDROXYCHLOROQUINE ON SEVERE COVID-19 DISEASE: A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL

M. Valizadeh^a, T. Tarjoman^a, B. Farhoudi^{a,b}, A. Chouhdari^a, M. Mesgarian^a, S. SeyedAlinaghi^b, M. Zangeneh^a, Z. Hanifezadeh^a, H.A. Atashi^a, H. Massumi-Naini^a, S. Abolghasemi^a, M. Dezfuleinejad^a, S. Haghani^c

^a Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

^b Iranian Research Center for HIV/AIDS (IRCHA), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^c Nursing and Midwifery Care Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract. *Background.* *In vitro* studies have shown some effects for Hydroxychloroquine (HCQ) against SARS-CoV-2 virus. Despite effective vaccination program, relatively large proportion of population remains unvaccinated. So, there still remains a need for other prophylactic measures. The present study aims to evaluate whether HCQ can prevent severe COVID-19 outcomes among health-care workers. *Materials and methods.* In this randomized, double blind placebo-controlled clinical trial 334 healthcare workers aged 18–65 years old were included of whom 278 individuals completed the study. Participants were randomly assigned to the HCQ group (800 mg at day one, followed by 400 mg weekly for the next 7 weeks); or the placebo group. Participants were followed three weeks after the last dose of drug or placebo (10 weeks from the first dose of drug or placebo). The primary outcome was hospitalization or death from COVID-19. *Results.* Of 148 people who received HCQ, none were hospitalized or died from COVID-19, while of 130 people who received the placebo, 2 (1.5%) were hospitalized for COVID-19 (p-value: 0.26). And, 22 (14.9%) people in the HCQ group and 15 (11.6%) people in the placebo group contracted COVID-19 (p-value: 0.99). Adverse reactions were reported by 5 (3.4%) of participants in the HCQ group and 5 (3.9%) of participants in the placebo group (p-value: 0.99). *Conclusion.* We found that HCQ has no significant prevention effect on the incidence of mild COVID-19. However, the low rate of hospitalization (the primary outcome) in this trial like most of the other clinical trials with HCQ would have required increasing the sample size considerably to be able to comment on the effectiveness of HCQ in prevention of severe forms including death rate. This justifies systematic reviews to include similar studies to further investigate the issue.

Key words: SARS-CoV-2, severe COVID-19, hydroxychloroquine, pre-exposure prophylaxis, adverse reactions, outcome.

Адрес для переписки:

Бехнам Фархуди
Больница Амир Аль Моменин, бульвар Тондгуян,
Тегеран, Иран.
Тел.: +982155346210
E-mai: b_farhoudi@yahoo.com

Contacts:

Behnam Farhoud
Amir Al Momenin Hospital, Tondgooyan Blvd,
Tehran, Iran.
Phone: +982155346210.
E-mai: b_farhoudi@yahoo.com

Для цитирования:

Вализаде М., Тарджоман Т., Фархуди Б., Чоудари А., Месгарян М., СейедАлиаги С., Зангене М., Ханифезаде З., Аташи Х.А., Массуми-Наини Х., Аболгасеми Ш., Дезфулинежад М., Хагани Ш. Влияние доконтактной профилактики гидроксихлорохином на развитие тяжелого COVID-19: рандомизированное контролируемое исследование // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1161–1168. doi: 10.15789/2220-7619-ETP-14481

Citation:

Valizadeh M., Tarjoman T., Farhoudi B., Chouhdari A., Mesgarian M., SeyedAlinaghi S., Zangeneh M., Hanifezadeh Z., Atashi H.A., Massumi-Naini H., Abolghasemi S., Dezfuleinejad M., Haghani S. Effect the pre-exposure prophylactic of hydroxychloroquine on severe COVID-19 disease: a randomized controlled trial // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1161–1168. doi: 10.15789/2220-7619-ETP-14481

ВЛИЯНИЕ ДОКОНТАКТНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ГИДРОКСИХЛОРОХИНОМ НА РАЗВИТИЕ ТЯЖЕЛОГО COVID-19: РАНДОМИЗИРОВАННОЕ КОНТРОЛИРУЕМОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Вализаде М.¹, Тарджоман Т.¹, Фархуди Б.^{1,2}, Чоудари А.¹, Месгарян М.¹, СейедАлинаги С.², Зангене М.¹, Ханифезаде З.¹, Аташи Х.А.¹, Массуми-Наини Х.¹, Аболгасеми Ш.¹, Дезфулинежад М.¹, Хагани Ш.³

¹ Больница Амир-аль-Моменин, Исламский университет Азад, Тегеран, Иран

² Иранский исследовательский центр ВИЧ/СПИДа, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

³ Исследовательский центр сестринского дела и акушерства, Иранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

Резюме. *История вопроса.* Исследования *in vitro* показали ряд эффектов гидроксихлорохина (HCQ) против вируса SARS-CoV-2. Несмотря на эффективную программу вакцинации, относительно большая часть населения остается непривитой. Таким образом, по-прежнему сохраняется необходимость в других профилактических мерах. Настоящее исследование нацелено на оценку возможности HCQ предотвратить тяжелые последствия COVID-19 среди медицинских работников. *Материалы и методы.* В настоящее рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование были включены 334 медицинских работника в возрасте от 18 до 65 лет, из которых 278 человек завершили исследование. Участники были случайным образом распределены в группу HCQ (800 мг в первый день, затем 400 мг еженедельно в течение следующих 7 недель) или группу плацебо. Эффективность мероприятий оценивали через 3 недели после приема последней дозы препарата или плацебо (через 10 недель после первой дозы препарата или плацебо). Основная конечная точка эффективности была представлена как уровень госпитализации или смерти пациента от COVID-19. *Результаты.* Из 148 человек, получавших HCQ, ни один не был госпитализирован и не умер от COVID-19, тогда как из 130 человек, получавших плацебо, 2 (1,5%) были госпитализированы с COVID-19 ($p = 0,26$). При этом 22 (14,9%) человека в группе HCQ и 15 (11,6%) человек в группе плацебо заразились COVID-19 ($p = 0,99$). О побочных реакциях сообщили 5 (3,4%) участников группы HCQ и 5 (3,9%) участников группы плацебо ($p = 0,99$). *Вывод.* Показано, что HCQ не оказывает существенного профилактического эффекта на заболеваемость легкой формой COVID-19. Однако низкий уровень госпитализации (основной результат) в этом исследовании, как и в большинстве других клинических исследований с HCQ, потребовал бы значительного увеличения размера выборки, чтобы иметь возможность оценить эффективность HCQ в предотвращении тяжелых форм, в том числе заканчивающихся летально. Это обосновывает необходимость проведения систематических обзоров с включением аналогичных исследований для дальнейшего изучения проблемы.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, тяжелая форма COVID-19, гидроксихлорохин, доконтактная профилактика, побочные реакции, результат.

Introduction

Coronaviruses are a group of RNA-coated viruses that cause widespread respiratory, intestinal, liver, and neurological diseases in humans and other mammals and birds [1]. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) was first reported in Wuhan in December 2019 then spread the world within weeks and initiated an ongoing pandemic [3, 4, 5, 6].

As of October 28, 2021, about 299 million people worldwide have been diagnosed with COVID-19 with more than 5.4 million deaths [5]. Iran has 8th rank in COVID-19 epidemic in the world where the number of infected patients is 6 204 925 and more than 131 847 deaths have occurred by 7/1/2022 [28].

Vaccination has had a substantial impact on case numbers and hospitalization in many countries, but limitations in global access to vaccines and reluctance to receive vaccines among some people mean that many populations remain vulnerable. Even in vaccinated individuals, uncertainties remain about duration of protection and efficacy of current vaccines against emerging SARS-CoV-2 variants [27]. So, there remains a need for more effective treatment and prophylactic measures.

Since the initiation of the COVID-19 outbreak, necessary actions have been taken to decrease the virus

transmission and mortality [4, 13]. Nearly 2000 ongoing clinical trials for the assessment of the efficacy of pharmacologic therapy against COVID-19 infection have been registered in the WHO International Clinical Trials Registry Platform. Nonetheless, the efficiency of no specific prophylactic drugs has been confirmed [15]. Available treatments are based on COVID-19 severity currently, which comprise corticosteroids, antiviral drugs, immunomodulators, neutralizing antibody therapies, cell therapy, and gene therapy [19].

Hydroxychloroquine (HCQ) was described to possess anti-SARS-CoV activity *in vitro* in the previous SARS outbreak. Therefore, HCQ may be a potential pharmacological agent for COVID-19 prophylaxis [30]. HCQ is a well-known disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARDs) which have been used for rheumatic diseases treatment as well as malaria prophylactic agent for decades. HCQ has immunomodulatory effects at cellular level. Specifically, inhibition of autophagy can prevent immune activation of different types of cells which inhibits cytokine production and modulates CD154 expression on T cells [17, 18, 19, 20, 21, 22].

HCQ's immunomodulatory profile, its ability to inhibit viral replication, and large amount of knowledge about the safety of this drug deriving from its use

in malaria prophylaxis and in the treatment of rheumatologic diseases, lead us to conduct this clinical trial to evaluate the pre-exposure prophylactic effect of HCQ on the incidence of severe COVID-19 disease in healthcare workers (HCW) in Iran.

Materials and methods

Study design. This study was a double-blind randomized placebo controlled clinical (field) trial with two parallel groups in 1 to 1 ratio. Written informed consent was obtained from all participants. The study was approved by the Iran National Committee for Ethics in Biomedical Research.

Study participants. Participants were randomly divided into HCQ and placebo groups. Healthcare workers of three hospitals affiliated to Islamic Azad University, Tehran Medical Unit (IAUTMU) and two day-surgery clinics in Tehran were invited to participate in the study. Between April 4, 2020 and October 21, 2020, we assessed 440 people for eligibility and enrolled 334 participants, of whom 278 individuals completed the study.

We estimated sample size using G*Power version 3.1.9.2. We estimated the minimum sample size assuming an expected incidence of 15% of COVID-19 in healthcare workers in the control (placebo) group and 5% in the HCQ group. Thus we required of a total 274 subjects (137 per group) for a significance level of 0.05, statistical power of 80% and assuming a rate of lost- to- follow up of 10%.

$$n = \frac{(z_{1-\frac{\alpha}{2}} + z_{1-\beta})(p_1q_1 + p_2q_2)}{d^2} = \frac{7.8 \times (0.15 \times 0.85 + 0.05 \times 0.95)}{0.1^2} = 137$$

Inclusion criteria. Healthcare workers aged 18–65 years who registered for the call, consented to participate in the study, had no suspected COVID-19 symptoms at the time of enrollment, and no previous history of COVID-19 disease were included in the study.

Exclusion criteria. Those with a history of allergy or intolerance to HCQ, any known drug contraindication including previous history of retinopathy or long QT syndrome, porphyria, HIV-positive patients, patients with autoimmune diseases, current use of immunosuppressive drugs, body mass index (BMI) > 40, moderate to severe renal insufficiency, history of arrhythmia and pregnancy were excluded from the trial.

Intervention. For the assessed drug, placebo was made in the same size, shape and packaging as the original drug by the drug manufacturer (Tehran Darou pharmaceutical Co.). Randomization was performed by an epidemiologist and a statistician (computer based randomization with blocks of 4). Drugs and placebos were coded based on the codes specified in the Balanced-Blocked Randomization table.

Participants entered the assigned groups based on their entry sequence. The participant and the personnel who delivered the drugs and placebo were blind to them. The person designated for coding drugs and placebos had no role in drug delivery, data gathering or data analysis. Individuals who measured the variables during the study were also blind about individuals belonging to the groups (two-way blindness).

All the participants were assessed on day 1 (enrollment day) for eligibility according to the inclusion and exclusion criteria and written consents were obtained.

The HCQ group received HCQ 800 mg (i.e. four 200 mg tablets in two divided doses) on day 1 at first week, followed by 400 mg (i.e. two 200 mg tablets in a single dose) weekly for the 7 doses. The control group received placebo pills in the same way. Participants were advised to take the pills after their meals.

Participants were evaluated weekly by trained staff. Symptoms of COVID-19 disease, drug adverse reaction (i.e. frequency and severity of drug related adverse events), medication adherence (i.e. treatment and number of drugs taken) were assessed in telephone interviews and recorded on pre-printed questionnaires. Participants were advised to call and see the designated staff in each facility within 24 hours if they experience any symptoms for assessment of health status and collection of nasopharyngeal swabs if indicated. Suspected cases of COVID-19 were managed according to the protocol of the Iran Ministry of Health.

All participants were followed for 3 weeks after the last received dose or more in cases of COVID-19 disease.

Outcomes. Primary outcome of the study was severe forms of COVID-19 disease (shortness of breath, persistent chest pain or pressure, decreased level of consciousness, cyanosis of the lips and face) requiring hospital admission (including ward or ICU) or death. The secondary outcomes were confirmed or probable COVID-19 and HCQ side effects. Probable COVID-19 was defined based on compatible clinical characteristics and/or computerized tomography (CT) finding. Confirmed cases were those with positive SARS-CoV-2 PCR testing.

Statistical analysis. Data were presented as numbers and proportions for categorical variables and mean±standard deviation (SD) for continuous variables. For assessment of the difference of demographic data, COVID-19 status, symptom of COVID-19, method of COVID-19 diagnosis, drug adverse reactions, and types of adverse drug reaction between HCQ and placebo groups chi-square (χ^2) test, fisher exact test, and independent t-test were used. To find an equation for the best prediction of the probability of COVID-19 incidence, multivariable logistic regression was applied. Odds ratios (ORs) and its 95% confidence intervals (CIs) were obtained. Two-sided p-value less than 0.05 was considered statistically significant. All analyses were conducted using SPSS version 19.

Results

Enrollment of participants was conducted as proposed in the project. We enrolled 334 participants in the study, 278 individuals completed the research (Fig.).

Demographics characteristics. One hundred forty-eight in HCQ group and 130 in placebo group completed the study. As it is shown in Table 1, there were no statistically significant differences in the demographic characteristics of the participants between the two groups.

COVID-19 status and adverse drug reaction. There were no statistically significant differences in the number of mild cases of COVID-19 between the two groups (Table 2). Of 56 people who left the study, two people developed mild COVID-19 disease as well.

We found no severe cases in individuals of HCQ arm. Two cases of the placebo group required hospitalization due to severe forms of COVID-19 disease which was not statistically significant. However, it might be clinically significant as 11.7% of COVID-19 cases in the placebo group required hospitalization (Table 2) versus no cases in HCQ arm.

In total, about 50% of cases were diagnosed based on clinical findings compatible with COVID-19 and there were no statistically significant differences between the two groups in the method of diagnosis of COVID-19 (P-value = 0.45, Table 2). Both cases of severe COVID-19 had positive PCR test results. Among patients with posi-

tive clinical plus positive chest CT scan findings, 3 cases (37.5%) had negative PCR tests.

No statistically significant differences were observed in the incidence and type of adverse drug reactions between the two groups (P-value = 0.99 and 0.94, respectively, Table 2). No serious HCQ related side effects were seen.

COVID-19 symptoms. The most frequent symptoms were fever, musculoskeletal pain and chills in both groups. There were no statistically significant differences in the symptoms of the involved cases between the two groups (Table 3).

Considering that none of the variables were statistically significant in the chi-square analysis and p-value was not below 0.1 in any of the analyzes, so to predict the incidence of COVID-19 in the two groups of HCQ and placebo, we entered all variables with a level of $p < 0.5$ into multivariable logistic regression analysis by backward stepwise method. However, in multivariable logistic regression analysis, none of the variables were statistically significant for predicting COVID-19 infection.

Discussion

In this randomized, double-blind, placebo-controlled trial, we investigated the efficacy of HCQ as COVID-19 pre-exposure prophylaxis. Our study showed no statistically significant difference be-

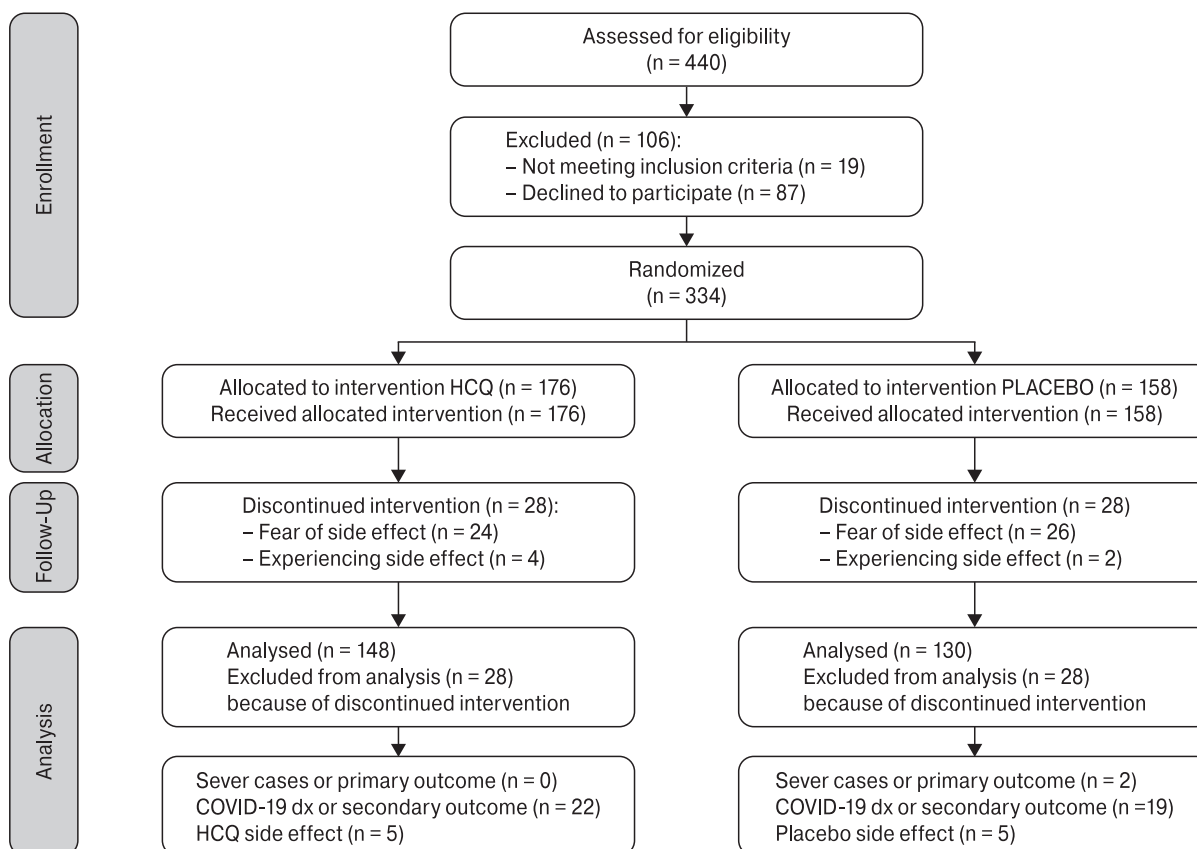


Figure. Flow of the participants through study

tween placebo and HCQ in preventing COVID-19 infection; however, we believe that the low event rate of hospitalization in our study like many other studies could have affected the result of the study.

Contradictory results have been observed in various studies investigating the effects of HCQ on COVID-19 outcomes [21, 22, 23, 24]. Currently, there are many studies that reported no added benefit for the use of CQ or HCQ in the treatment of COVID-19 patients [5, 6, 7, 8]. However, most of these studies are reported to be underpowered to comment on the mortality as primary outcome because of the low event rate of mortality. Skipper et al. mentioned increasing the sample size to about 6000 would have been needed to evaluate the effectiveness of HCQ while they recruited 423 participants. For this reason, they changed the primary outcome from severe forms of COVID-19 to “change in overall symptom severity over 14 days” [25]. A recent multicenter, population-based national retrospective-cohort study of 28 759 adults with mild COVID-19 showed that the odds of hospitalization or death was reduced significantly in patients

who were given HCQ early in the course of COVID-19 disease [18]. Ip et al. also reported that in SARS-CoV-2 infected non-hospitalized patients, HCQ exposure was associated with a decreased rate of subsequent hospitalization (OR 0.53; 95% CI, 0.29, 0.95) [10].

On the other hand, the available evidence indicates that the drug should be started early in the course of the disease to show outcome benefits. Other studies that investigated whether post-exposure prophylaxis could prevent COVID-19 failed to show preventive effect on the illness [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23].

However, there is some concern that the post-exposure drug may have not achieved adequate concentrations early enough to show a benefit [23]. Rajasingham R. et al. investigated the efficacy of HCQ as pre-exposure prophylaxis for COVID-19 in healthcare workers and reported no statistically significant difference. They recruited the study from a broad geographic area to increase the generalizability of the findings [20]. We also tried to enroll our study participants from different

Table 1. Demographics characteristics of the participants

Characteristics		HCQ (n = 148) N (%)	Placebo (n = 130) N (%)	P-value
Gender	Male	74 (50)	73 (56.2)	0.31
	Female	74 (50)	57 (43.8)	
Marital status	Single	37 (25)	35 (26.9)	0.57
	Married	111 (75)	95 (73.1)	
Ethnicity	Persian	77 (52)	72 (55.4)	0.57
	Non-Persian	71 (48)	58 (44.6)	
Education level	Diploma and lower	29 (19.6)	27 (20.8)	0.87
	Bachelor	75 (50.7)	70 (53.8)	
	Student	17 (11.5)	12 (9.2)	
	Master and higher	27 (18.2)	21 (16.2)	
Smoking	No	134 (90.5)	118 (90.8)	0.94
	Yes	14 (9.5)	12 (9.2)	
Comorbidity*	No	138 (93.2)	119 (91.5)	0.59
	Yes	10 (6.8)	11 (8.5)	
Medication	No	138 (93.2)	120 (92.3)	0.76
	Yes	10 (6.8)	10 (7.7)	
Age (year), mean± SD		38.98±10.71	39.39±10.33	0.74

Note. *Including Diabetes Mellitus, hypertension, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), Asthma.

Table 2. Comparison of COVID-19 status and adverse drug reaction in HCQ and Placebo groups

Variables		HCQ (n = 148) N (%)	Placebo (n = 130) N (%)	OR (95%CI)	P-value
COVID-19 status	None	126 (85.1)	113 (86.9)	-	0.26
	Mild	22 (14.9)	15 (11.6)		
	Severe	0 (0)	2 (1.5)		
Adverse reactions	No	143 (96.6)	125 (96.1)	1.18 (0.42–3.27)	0.99
	Yes	5 (3.4)	5 (3.9)		
Diagnosis method	Clinical only	11 (50)	9 (52.9)	-	0.45
	Clinical+PCR	6 (27.3)	6 (35.3)		
	Clinical+CT	3 (13.6)	0 (0)		
	Clinical+PCR+CT	2 (9.1)	2 (11.8)		
Adverse reaction types	None	142 (94)	129 (94.9)	-	0.94
	Gastrointestinal (GI)	3 (2)	2 (1.5)		
	Headache	1 (0.7)	1 (0.7)		
	Cardiac	1 (0.7)	1 (0.7)		
	GI and headache	2 (1.3)	1 (0.7)		
	Eye	0 (0)	1 (0.7)		
Fatigue	2 (1.3)	1 (0.7)			

Table 3. Comparison of symptoms of COVID-19 patients in two HCQ and Placebo groups

Symptoms	HCQ group (n = 22) N (%)	Placebo group (n = 17) N (%)	P-value
Fever	15 (68.2)	14 (82.4)	0.46
Chills	14 (63.6)	11 (64.7)	0.94
Cough	10 (45.5)	6 (35.3)	0.52
Shortness of breath	10 (45.5)	3 (17.6)	0.06
Anorexia	11 (50)	4 (23.5)	0.09
Running nose	6 (27.3)	1 (5.9)	0.11
Decreased sense of smell	9 (40.9)	4 (23.5)	0.25
Decreased taste	2 (9.1)	0 (0)	0.49
Headache	7 (31.8)	5 (29.4)	0.87
Sore throat	4 (18.2)	1 (5.9)	0.36
Chest pain	3 (13.6)	1 (5.9)	0.62
Myalgia	16 (72.7)	13 (76.5)	0.79
Nausea	4 (18.2)	1 (5.9)	0.36
Vomiting	1 (4.5)	0 (0)	0.99
Diarrhea	5 (22.7)	2 (11.8)	0.44

health settings to increase the generalizability of our study. In their study the total number of PCR confirmed COVID-19 patients among total cases of COVID-19 were 18% [20], in comparison to ours of 36%. Another randomized double-blind placebo-controlled clinical trial reported no clinical benefit for HCQ when administered daily for 8 weeks as pre-exposure prophylaxis in COVID-19 patients [1]. This study was limited by early termination. The primary outcome of this study was the incidence of SARS-CoV-2 infection as determined by a nasopharyngeal swab. In comparison, in our study the primary outcome was severe COVID-19. We decided to do that because our main hypothesis was that HCQ as a disease modifying agent may prevent severe disease. Another similar study was conducted by Berta et al., among healthcare workers. However, the community incidence of SARS-CoV-2 events decreased during their study. So this study was also deemed underpowered to answer the main objective [7].

Similar to these studies [20, 21, 23, 24, 25, 27], our study did not show any significant differences in infection incidence between HCQ and control groups. We did not also see a statistical difference in incidence of symptoms of COVID-19 cases between the two groups. The most frequent symptoms in both groups were fever and chills. However, we found two severe cases in the control group with no severe cases in HCQ group. These may have clinical importance and rationalize further investigations with more cases in the future studies. At this time, with the current sta-

tus of pandemic and availability of effective vaccines, it is unlikely to have the opportunity to run new original studies that investigate the effect of HCQ prophylaxis on COVID-19. However, there are some studies on the same issue not published yet. We recommend systematic reviews to include the data of studies similar to ours' that are pending to be published and also inclusion of the studies that HCQ has started early in the course of COVID-19 to further illuminate the issue.

Similar to other studies of HCQ for either prophylaxis or COVID-19 treatment [21, 23, 24, 25, 27], we found that the medication was generally well tolerated. In our study we had advised the participants to take the medication after meal knowing that the gastrointestinal side effect is the most frequently reported side effect of the HCQ and we observed that HCQ is better tolerated after meal.

Study limitations. The most important limitation of our study was the small sample size of the study. Like many other studies with HCQ, our study suffered from the exclusion of the old age group which we know is the most vulnerable. The other limitation was free testing shortages which made it impossible to frequently check the PCR status to detect the asymptomatic COVID-19 infections.

Conclusion

Our study showed no differences in COVID-19 incidence between HCQ and control group. However, we found no severe cases in the HCQ arm but in the placebo group two cases required hospitalization. The low rate of hospitalization (the primary outcome) in this trial like most of the above mentioned clinical trials with HCQ would have required increasing the sample size considerably to be able to comment on the effectiveness of HCQ in prevention of severe forms including death rate. It justifies systematic reviews to include similar studies to further investigate the issue.

Additional information

Funding. The project funding was provided by Islamic Azad University.

Declaration of competing interest. All authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study was approved by the Iran National Committee for Ethics in Biomedical Research (Ethics code: IR.IAU.PS.REC.1399.001). The study was also registered on IRCT site (IRCT20200424047184N1). The authors would like to acknowledge Zahra Eskandari for her great cooperation in follow ups.

References

- Abella B.S., Jolkovsky E.L., Biney B.T., Uspal J.E., Hyman M.C., Frank I., Hensley S.E., Gill S., Vogl D.T., Maillard I., Babushok D.V., Huang A.C., Nasta S.D., Walsh J.C., Wiletyo E.P., Gimotty P.A., Milone M.C., Amaravadi R.K.; Prevention and Treatment of COVID-19 With Hydroxychloroquine (PATCH) Investigators. Efficacy and Safety of Hydroxychloroquine vs Placebo for Pre-exposure SARS-CoV-2 Prophylaxis Among Health Care Workers: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern. Med.*, 2021, vol. 181, no. 2, pp. 195–202. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.6319

2. Boulware D.R., Pullen M.F., Bangdiwala A.S., Pastick K.A., Lofgren S.M., Okafor E.C., Skipper C.P., Nascene A.A., Nicol M.R., Abassi M., Engen N.W., Cheng M.P., LaBar D., Lother S.A., MacKenzie L.J., Drobot G., Marten N., Zarychanski R., Kelly L.E., Schwartz I.S., McDonald E.G., Rajasingham R., Lee T.C., Hullsiek K.H. A randomized trial of hydroxychloroquine as postexposure prophylaxis for Covid-19. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 383, no. 6, pp. 517–525. doi: 10.1056/NEJMoa2016638
3. Cao B., Wang Y., Wen D., Liu W., Wang J., Fan G., Ruan L., Song B., Cai Y., Wei M., Li X., Xia J., Chen N., Xiang J., Yu T., Bai T., Xie X., Zhang L., Li C., Yuan Y., Chen H., Li H., Huang H., Tu S., Gong F., Liu Y., Wei Y., Dong C., Zhou F., Gu X., Xu J., Liu Z., Zhang Y., Li H., Shang L., Wang K., Li K., Zhou X., Dong X., Qu Z., Lu S., Hu X., Ruan S., Luo S., Wu J., Peng L., Cheng F., Pan L., Zou J., Jia C., Wang J., Liu X., Wang S., Wu X., Ge Q., He J., Zhan H., Qiu F., Guo L., Huang C., Jaki T., Hayden F.G., Horby P.W., Zhang D., Wang C. A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 382, no. 19, pp. 1787–1799. doi: 10.1056/NEJMoa2001282
4. Dadras O., Alinaghi S.A.S., Karimi A., Mohssenipour M., Barzegary A., Vahedi F., Pashaei Z., Mirzapour P., Fakhfoury A., Zargari G., Saeidi S., Mojdeganlou H., Badri H., Qaderi K., Behnezhad F., Mehraeen E. Effects of COVID-19 prevention procedures on other common infections: a systematic review. *Eur. J. Med. Res.*, 2021, vol. 26, no. 1: 67. doi: 10.1186/s40001-021-00539-1
5. Eze P., Mezue K.N., Nduka C.U., Obianyo I., Egbuche O. Efficacy and safety of chloroquine and hydroxychloroquine for treatment of COVID-19 patients—a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Cardiovasc. Dis.*, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 93–107
6. Girum T., Lentiro K., Geremew M., Migora B., Shewamare S. Global strategies and effectiveness for COVID-19 prevention through contact tracing, screening, quarantine, and isolation: a systematic review. *Trop. Med. Health*, 2020, vol. 48, no. 1: 91. doi: 10.1186/s41182-020-00285-w
7. Grau-Pujol B., Camprubi-Ferrer D., Marti-Soler H., Fernández-Pardos M., Carreras-Abad C., Andrés M.V., Ferrer E., Muelas-Fernandez M., Jullien S., Barilaro G., Ajanovic S., Vera I., Moreno L., Gonzalez-Redondo E., Cortes-Serra N., Roldán M., Arcos A.A., Mur I., Domingo P., Garcia F., Guinovart C., Muñoz J. Pre-exposure prophylaxis with hydroxychloroquine for COVID-19: a double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial. *Trials*, 2021, vol. 22, no. 1: 808. doi: 10.1186/s13063-021-05758-9
8. Group RECOVERY Collaborative; Horby P., Mafham M., Linsell L., Bell J.L., Staplin N., Emberson J.R., Wiselka M., Ustianowski A., Elmahi E., Prudon B., Whitehouse T., Felton T., Williams J., Faccenda J., Underwood J., Baillie J.K., Chappell L.C., Faust S.N., Jaki T., Jeffery K., Lim W.S., Montgomery A., Rowan K., Tarning J., Watson J.A., White N.J., Juszczak E., Haynes R., Landray M.J. Effect of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 383, no. 21, pp. 2030–2040. doi: 10.1056/NEJMoa2022926
9. 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
10. Ip A., Ahn J., Zhou Y., Goy A.H., Hansen E., Pecora A.L., Sinclair B.A., Bednarz U., Marafelias M., Sawczuk I.S., Underwood J.P. 3rd, Walker D.M., Prasad R., Sweeney R.L., Ponce M.G., La Capra S., Cunningham F.J., Calise A.G., Pulver B.L., Ruocco D., Mojares G.E., Eagan M.P., Ziontz K.L., Mastrokyriakos P., Goldberg S.L. Hydroxychloroquine in the treatment of outpatients with mildly symptomatic COVID-19: a multi-center observational study. *BMC Infect. Dis.*, 2021, vol. 21, no. 1: 72. doi: 10.1186/s12879-021-05773-w
11. Jorge A. Hydroxychloroquine in the prevention of COVID-19 mortality. *Lancet Rheumatol.*, 2021, vol. 3, no. (1): e2–e3. doi: 10.1016/S2665-9913(20)30390-8
12. Kuznik A., Bencina M., Svajcer U., Jeras M., Rozman B., Jerala R. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J. Immunol.*, 2011, vol. 186, no. 8, pp. 4794–804. doi: 10.4049/jimmunol.1000702
13. Lahiri A., Jha S.S., Bhattacharya S., Ray S., Chakraborty A. Effectiveness of preventive measures against COVID-19: a systematic review of In Silico modeling studies in indian context. *Indian J. Public Health*, 2020, vol. 64, suppl.: S156–S167. doi: 10.4103/ijph.IJPH_464_20
14. Li X., Wang Y., Agostinis P., Rabson A., Melino G., Carafoli E., Shi Y., Sun E. Is hydroxychloroquine beneficial for COVID-19 patients? *Cell Death Dis.*, 2020, vol. 11, no. 7: 512. doi: 10.1038/s41419-020-2721-8
15. Lin S.N., Rui J., Chen Q.P., Zhao B., Yu S.S., Li Z.Y., Zhao Z.Y., Wang Y., Zhu Y.Z., Xu J.W., Yang M., Liu X.C., Yang T.L., Luo L., Deng B., Huang J.F., Liu C., Li P.H., Liu W.K., Xie F., Chen Y., Su Y.H., Zhao B.H., Chiang Y.C., Chen T.M. Effectiveness of potential antiviral treatments in COVID-19 transmission control: a modelling study. *Infect. Dis. Poverty.*, 2021, vol. 10, no. 1: 53. doi: 10.1186/s40249-021-00835-2
16. Meo S.A., Klonoff D.C., Akram J. Efficacy of chloroquine and hydroxychloroquine in the treatment of COVID-19. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2020, vol. 24, no. 8, pp. 4539–4547. doi: 10.26355/eurrev_202004_21038
17. Kapoor K.M., Kapoor A. Role of chloroquine and hydroxychloroquine in the treatment of COVID-19 infection — a systematic literature review. *medRxiv*, 2020. doi: 10.1101/2020.03.24.20042366
18. Mokhtari M., Mohraz M., Gouya M.M., Namdari Tabar H., Tabrizi J.S., Tayeri K., Aghamohamadi S., Rajabpoor Z., Karami M., Raeisi A., Rahmani H., Khalili H. Clinical outcomes of patients with mild COVID-19 following treatment with hydroxychloroquine in an outpatient setting. *Int. Immunopharmacol.*, 2021, vol. 96: 107636. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107636
19. Rahman A. Effectiveness of current treatments for Covid-19. *Preprints*, 2020: 2020110372. doi: 10.20944/preprints202011.0372.v1
20. Rajasingham R., Bangdiwala A.S., Nicol M.R., Skipper C.P., Pastick K.A., Axelrod M.L., Pullen M.F., Nascene A.A., Williams D.A., Engen N.W., Okafor E.C., Rini B.I., Mayer I.A., McDonald E.G., Lee T.C., Li P., MacKenzie L.J., Balko J.M., Dunlop S.J., Hullsiek K.H., Boulware D.R., Lofgren S.M.; COVID PREP team. Hydroxychloroquine as pre-exposure prophylaxis for Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in healthcare workers: a randomized trial. *Clin. Infect. Dis.*, 2021, vol. 72, no. 11, pp. e835–e843. doi: 10.1093/cid/ciaa1571
21. Saghri S.A.M., AlGabri N.A., Alagawany M.M., Attia Y.A., Alyileili S.R., Elnesr S.S., Shafi M.E., Al-Shargi O.Y.A., Al-Balagi N., Alwajeeh A.S., Alsalahi O.S.A., Patra A.K., Khafaga A.F., Negida A., Noreldin A., Al-Amarat W., Almaiman A.A., El-

- Tarabily K.A., Abd El-Hack M.E. Chloroquine and hydroxychloroquine for the prevention and treatment of COVID-19: a fiction, hope or hype? An updated review. *Ther. Clin. Risk Manag.*, 2021, vol. 17, pp. 371–387. doi: 10.2147/TCRM.S301817
22. Schrezenmeier E., Dörner T. Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2020, vol. 16, no. 3, pp. 155–166. doi: 10.1038/s41584-020-0372-x
 23. Shabani M., Totonchi M., Rezaeimirghaed O., Gachkar L., Hajiesmaeili M., Khoshkar A., Amirdosara M., Saffaei A., Shokouhi S., Mardani M., Alavi Darazam I., Karami A., Sharifi M., Zaman M., Abedheydari E., Sahraei Z. Evaluation of the prophylactic effect of hydroxychloroquine on people in close-contact with patients with COVID-19. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2021, vol. 70: 102069. doi: 10.1016/j.pupt.2021.102069
 24. Singh H., Chauhan P., Kakkar A.K. Hydroxychloroquine for the treatment and prophylaxis of COVID-19: the journey so far and the road ahead. *Eur. J. Pharmacol.*, 2021, vol. 890: 173717. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173717
 25. Skipper C.P., Pastick K.A., Engen N.W., Bangdiwala A.S., Abassi M., Lofgren S.M., Williams D.A., Okafor E.C., Pullen M.F., Nicol M.R., Nascene A.A., Hullsiek K.H., Cheng M.P., Luke D., Lother S.A., MacKenzie L.J., Drobot G., Kelly L.E., Schwartz I.S., Zarychanski R., McDonald E.G., Lee T.C., Rajasingham R., Boulware D.R. Hydroxychloroquine in nonhospitalized adults with early COVID-19: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.*, 2020, vol. 173, no. 8, pp. 623–631. doi: 10.7326/M20-4207
 26. Van den Borne B.E., Dijkmans B.A., de Rooij H.H., le Cessie S., Verweij C.L. Chloroquine and hydroxychloroquine equally affect tumor necrosis factor-alpha, interleukin 6, and interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells. *J. Rheumatol.*, 1997, vol. 24, no. 1, pp. 55–60.
 27. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) dashboard. 2021. URL: <https://covid19.who.int> (07.01.2022)
 28. Worldometer. URL: <https://www.worldometers.info> (07.01.2022)
 29. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., Hu Y., Tao Z.W., Tian J.H., Pei Y.Y., Yuan M.L., Zhang Y.L., Dai F.H., Liu Y., Wang Q.M., Zheng J.J., Xu L., Holmes E.C., Zhang Y.Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020, vol. 579, no. 7798, pp. 265–269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3
 30. Yao X., Ye F., Zhang M., Cui C., Huang B., Niu P., Liu X., Zhao L., Dong E., Song C., Zhan S., Lu R., Li H., Tan W., Liu D. In vitro antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 71, no. 15, pp. 732–739. doi: 10.1093/cid/ciaa237

Авторы:

Вализаде М., доцент, кафедра внутренней медицины, медицинский факультет, Исламский университет Азад, Тегеран, Иран;
Тарджоман Т., доцент, Центр исследований социальных детерминант здоровья, Исламский университет Азад, Тегеран, Иран;
Фархуди Б., доцент кафедры инфекционных заболеваний медицинского факультета, Исламский университет Азад, Тегеран, Иран;
Чоудари А., доцент, Центр исследований социальных детерминант здоровья, Исламский университет Азад, Тегеран, Иран;
Месгарян М., доцент кафедры инфекционных болезней медицинского факультета, Исламский университет Азад, Тегеран, Иран;
СейедАлинаги С., магистр философии, кандидат наук, клинический эпидемиолог, доцент, зам. руководителя по исследовательской деятельности Иранского исследовательского центра по ВИЧ/СПИД, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;
Зангене М., профессор кафедры инфекционных болезней медицинского факультета, Исламский университет Азад, Тегеран, Иран;
Ханифезаде З., бакалавр акушерства, Исламский университет Азад, Тегеран, Иран;
Аташи Х.А., научный сотрудник, Исламский университет Азад, Тегеран, Иран;
Массуми-Наини Х., доцент кафедры внутренней медицины медицинского факультета, Исламский университет Азад, Тегеран, Иран;
Аболгасеми Ш., доцент кафедры внутренней медицины медицинского факультета, Исламский университет Азад, Тегеран, Иран;
Дезфулинежад М., доцент кафедры инфекционных болезней медицинского факультета больницы Буали, Исламский университет Азад, Тегеран, Иран;
Хагани Ш., исследовательский центр сестринского дела и акушерства, Иранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран.

Authors:

Valizadeh M., Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran;
Tarjoman T., Assistant Professor, Social Determinants of Health Research Center, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran;
Farhoudi B., Associate Professor, Department of Infection Disease, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran;
Chouhdari A., Assistant Professor, Social Determinants of Health Research Center, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran;
Mesgarian M., Assistant Professor, Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran;
SeyedAlinaghi S., MD, MPhil, PhD, Clinical Epidemiologist, Associate Professor, Iranian Research Center for HIV/AIDS (IRCHA), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;
Zangeneh M., Professor, Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran;
Hanifzadeha Z., Bachelor (Midwifery), Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran;
Atashi H.A., Researcher, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran;
Massumi-Naini H., Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran;
Abolghasemi S., Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University Tehran, Iran;
Dezfulinejad M., Assistant Professor, Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran;
Haghani S., Nursing and Midwifery Care Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

MONKEYPOX: A SYSTEMATIC REVIEW OF EPIDEMIOLOGY, PATHOGENESIS, MANIFESTATIONS, AND OUTCOMES

S. SeyedAlinaghi^a, A.M. Afsahi^b, A. Afzalian^c, R. Shahidi^d, S.S. Tamheri Zadeh^a, S. Varshochi^c, M. Dashti^e, A. Ghasemzadeh^e, A. Pashaei^{a,f}, P. Paranjkhoo^g, Z. Parmoon^a, S.N. Parikhani^c, A. Shamsabadi^h, S. Ahmadi^c, P. Pezeshgiⁱ, G. Arjmand^j, M. Javaherian^c, H. Ebrahimi^a, A. Karimi^c, E. Mehraeen^k, S. Jahanfar^l

^a Iranian Research Center for HIV/AIDS, Iranian Institute for Reduction of High Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^b University of California, San Diego (UCSD), California, USA

^c Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^d Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

^e Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

^f University of British Columbia, Vancouver, Canada

^g American University of Armenia, Yerevan, Armenia

^h Esfarayen Faculty of Medical Sciences, Esfarayen, Iran

ⁱ Maragheh University of Medical Sciences, Maragheh, Iran

^j Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^k Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran

^l Tufts University School of Medicine, Boston, USA

Abstract. *Introduction.* Since May 2022, an unusually large number of new monkeypox infections—a previously rare viral zoonotic disease, mainly reported from central and western Africa has been reported globally, and the World Health Organization (WHO) declared a global health emergency in July 2022. We aimed to systematically review the monkeypox virus epidemiology, pathogenesis, transmission, presentations, and outcomes. *Materials and methods.* Our aim is to systematically review the epidemiology, pathogenesis, manifestations, and outcomes of Monkeypox disease. We searched the keywords in the online databases of PubMed, Embase, Scopus, and Web of Science and investigated all English articles until December 2022. In order to ascertain the findings, this study adheres to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) checklist. In order to optimize the quality, this review study benefits from the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) checklist. To minimize any probable bias risk, we utilized the Newcastle-Ottawa Scale (NOS) risk assessment tool. *Results.* The most prevalent symptoms were rash and fever. The infection was accompanied by different complications such as, but not limited to, encephalitis (mainly in children), septicemia, bacterial cellulitis, retropharyngeal and parapharyngeal abscesses, etc. A wide range of hospitalization from 3.7% to 100% has been reported. The mortality rate ranged from 0% to 23%, which mainly occurred in infants and children. High mortality of the monkeypox rate was reported among pregnant women. The mortality rate of monkeypox is lower among women and those who received the smallpox vaccine compared to men and those

Адрес для переписки:

Эсмаэил Мехраин
5681761351, Иран, г. Халхал, Халхальский медицинский университет, кафедра медицинских информационных технологий.
Тел.: +98-45-32426801. Факс: +98-45-32422305.
E-mail: es.mehraeen@gmail.com

Contacts:

Esmail Mehraeen
5681761351, Iran, Khalkhal, Khalkhal University of Medical Sciences, Department of Health Information Technology.
Phone: +98-45-32426801. Fax: +98-45-32422305.
E-mail: es.mehraeen@gmail.com

Для цитирования:

СейедАлиаги С., Афсахи А.М., Афзалиан А., Шахиди Р., Тамехри-заде С.С., Варшочи С., Дашти М., Гасемзаде А., Пашаи А., Паранджху П., Пармун З., Парихани С.Н., Шамсабади А., Ахмади С., Пезешги П., Арджманд Г., Джавахериян М., Эбрахими Х., Карими А., Мехраин И., Джаханфар Ш. Оспа обезьян: систематический обзор эпидемиологии, патогенеза, проявлений и исходов // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1169–1186. doi: 10.15789/2220-7619-MAS-15632

Citation:

SeyedAlinaghi S., Afsahi A.M., Afzalian A., Shahidi R., Tamheri Zadeh S.S., Varshochi S., Dashti M., Ghasemzadeh A., Pashaei A., Paranjkhoo P., Parmoon Z., Parikhani S.N., Shamsabadi A., Ahmadi S., Pezeshgi P., Arjmand G., Javaherian M., Ebrahimi H., Karimi A., Mehraeen E., Jahanfar S. Monkeypox: a systematic review of epidemiology, pathogenesis, manifestations, and outcomes // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1169–1186. doi: 10.15789/2220-7619-MAS-15632

who did not receive the vaccine. A wide range of the overall second-rate attack was reported, which is more pronounced in unvaccinated patients. *Conclusion.* In our systematic review of 35 studies on monkeypox, we cast light on the existing evidence on its epidemiology, pathogenesis, manifestation, and outcomes. Further studies are needed to elucidate the natural history of the disease in various patients' population, as well as detailing the monkeypox attack rate.

Key words: monkeypox, monkeypox virus, monkeypox infections, epidemiology, pathogenesis, manifestations.

ОСПА ОБЕЗЬЯН: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЭПИДЕМИОЛОГИИ, ПАТОГЕНЕЗА, ПРОЯВЛЕНИЙ И ИСХОДОВ

СейедАлиаги С.¹, Афсахи А.М.², Афзаян А.³, Шахиди Р.⁴, Тамехри-заде С.С.¹, Варшочи С.³, Дашти М.⁵, Гасемзаде А.⁵, Пашаи А.^{1,6}, Паранджху П.⁷, Пармун З.¹, Парихани С.Н.³, Шамсабади А.⁸, Ахмади С.³, Пезешги П.⁹, Арджманд Г.¹⁰, Джавахериан М.³, Эбрахими Х.¹, Карими А.³, Мехраин И.¹¹, Джаханфар Ш.¹²

¹Иранский исследовательский центр ВИЧ/СПИДа, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

²Калифорнийский университет, Сан-Диего (UCSD), Калифорния, США

³Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

⁴Университет медицинских наук Бушера, Бушер, Иран

⁵Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

⁶Университет Британской Колумбии, Ванкувер, Канада

⁷Американский университет Армении, Ереван, Армения

⁸Факультет медицинских наук Эсфахаен, Эсфахаен, Иран

⁹Университет медицинских наук Мараге, Мараге, Иран

¹⁰Университет медицинских наук Шахиди Бехешти, Тегеран, Иран

¹¹Халхалский университет медицинских наук, Халхал, Иран

¹²Медицинский факультет Университета Тафтса, Бостон, США

Резюме. *Введение.* С мая 2022 г. во всем мире было зарегистрировано необычно большое количество новых случаев заражения оспой обезьян — ранее редкой вирусной зоонозной болезнью, в основном зарегистрированной в Центральной и Западной Африке, а в июле 2022 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила глобальную чрезвычайную ситуацию. Целью настоящей работы было проведение систематического анализа эпидемиологии, патогенеза, передачи, проявлений и исходов оспы обезьян. *Материалы и методы.* Был проведен поиск по ключевым словам в онлайн-базах данных PubMed, Embase, Scopus и Web of Science и изучены все статьи на английском языке, опубликованные до декабря 2022 г. В целях оптимизации качества использовался контрольный список «Предпочтительные элементы отчетности для систематических обзоров и метаанализов» (PRISMA). Для минимизации потенциального риска систематических ошибок мы использовали оценку риска по шкале Ньюкасла–Оттавы (NOS). *Результаты.* Наиболее распространенными симптомами были сыпь и лихорадка. Инфекция сопровождалась различными осложнениями, среди прочего представленными энцефалитом (преимущественно у детей), септициемией, бактериальным целлюлитом, заглочными и парафарингеальными абсцессами и др. Были госпитализированы от 3,7 до 100% больных. Уровень смертности колебался от 0 до 23%, преимущественно среди младенцев и детей. Отмечена высокая смертность от оспы обезьян среди беременных женщин. Уровень смертности среди женщин и тех, кто получил вакцину от оспы, был ниже по сравнению с мужчинами и невакцинированными лицами. Зафиксирован широкий диапазон вторичных случаев инфекции, которая более выражена у непривитых пациентов. *Заключение.* В настоящем систематическом обзоре проанализированы 35 исследований оспы обезьян, позволивших пролить свет на имеющиеся данные о ее эпидемиологии, патогенезе, проявлениях и исходах. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения естественного течения заболевания у различных групп пациентов, а также детализации частоты заражения оспой обезьян.

Ключевые слова: оспа обезьян, вирус оспы обезьян, инфекции, вызванные оспой обезьян, эпидемиология, патогенез, проявления.

Introduction

Monkeypox virus — an enveloped double-stranded DNA virus with linear genome, from the *Orthopoxvirus* genus of the *Poxviridae* family — was first discovered in 1958 in Denmark after two outbreaks of rash disease occurred among monkeys that were kept for research purposes [52]. The first known human infection was diagnosed in the Democratic Republic of the Congo (DRC) in 1970 amid the latest phase of intense smallpox eradication programs in Africa [32]. Despite its nomenclature as “monkey-

pox”, the primary source is unknown and rodents or non-human primates—including monkeys—are mainly considered the possible source for the spread of the disease [8, 54]. Monkeypox was primarily known as a rare zoonotic disease specifically reported from forested regions of central and western Africa, with almost all cases spreading from animals to humans. Since its acknowledgment as a human pathogen, in the twentieth century confirmed cases of the disease have been reported in 11 African countries, and later, some self-restrictive human outbreaks occurred inside and outside Africa as follows; The Republic

of Congo in 2003 (6 cases), the US in 2003 (70 cases), South Sudan in 2005 (9 cases), Nigeria in 2017 (200 cases) [16, 30, 41, 55] but approximately all diagnosed cases outside Africa reported a travel history or a close link to this continent.

Additionally, according to the World Health Organization (WHO) reports in the first two decades of the 21st century the quantity of monkeypox suspected patients was estimated to be approximately 18 000 cases in DRC, and between 2020 to May 2022 around 10 545 possible cases and 362 associated mortalities have occurred in DRC [57]. The most common transmission mode was via physical contact with an infected animal's body fluids, cutaneous or mucosal lesions, respiratory aerosol droplets, and even their meat or corpse [56]. In addition, human-human infection can also occur via respiratory secretions, cutaneous lesions, or contaminated objects [33, 55].

Since May 2022 — in the absence of travel histories or direct links to the endemic countries — an unusual large quantity of monkeypox new cases has been reported, and unfortunately, due to the ascending numbers of new cases WHO declared a global health emergency on July 23 2022. According to the WHO report on August 10 2022, 27 814 laboratory-confirmed cases of monkeypox and 11 deaths have been reported in 89 countries/territories/areas [56]. Confirmed cases were from all six WHO regions as follows; 375 cases and 7 deaths in Africa, 10 815 cases and 1 death in region of the Americas, 31 cases and no deaths in Eastern Mediterranean Region, 16 495 new cases and 2 deaths in European region, 13 cases and 1 death in South-East Asia Region, and 85 cases and no deaths in Western Pacific Region [56]. Of the aforementioned cases that had available data (73%), interestingly, 99% (16 839/17 052) are males, with a median age of 36 years. Monkeypox, affects males between the age of 18 to 44 cases disproportionately, as they account of 77% of cases, and less than 1% (98/17 426) of cases were between 0–17 years [56]. With known sexual orientation, 60% (1214/2025) identified themselves as gay, bisexual and other men who have sex with men. In addition, in cases with known HIV status, 39% (3204/8234) were HIV positive. Also, among the reported cases, 33% (7741/23 290) had available information on sexual orientation, and of these, 97% (7541/7741) identified themselves as gay, bisexual, and other men who have sex with men. In addition, among cases with available information, 91% (4856/5315) of patients reported transmission through sexual contacts [56]. This has risen, worldwide concerns about possible alterations in the disease's mode of transmission and virulence [55].

Monkeypox can cause a spectrum of pox-like signs and symptoms with a milder fashion, a better prognosis, and rare mortalities. The most common signs and symptoms were described as generalized myalgia, headache, fatigue, back pain, and lymphadenopathy followed by a generalized centrifugal

rash, which could occur on the face (in 95% of cases), palms, and soles (in 75% of cases), eyes (in 20% of cases), mouth and throat mucous membranes (in 70% of cases), groin, and genitals (in 30% of cases) — that takes 2–4 weeks to resolve without any critical intervention [9]. In this outbreak, widespread rash, fever, and genital rash have been reported in 81%, 50%, and 41% of cases respectively [55].

In regards to the prognosis of the current outbreak as of the beginning of 2022, 73 mortalities have been reported in Africa (endemic region), while 11 deaths have occurred among 27 814 cases reported by WHO on August 10, 2022 [56]. Due to its unusually rapid spread, which could be due to the waning efficacy of smallpox vaccinations worldwide, and the declared global health emergency, this virus has provoked global concerns amid the catastrophic ongoing COVID-19 pandemic, and people are afraid to fall into another disastrous high-burden pandemic. Therefore, we aimed to systematically review the currently available literature on the monkeypox virus, and shed light on changes in its epidemiology, pathogenesis, transmission, presentations, and outcomes.

Materials and methods

The mission of this comprehensive study is to systematically review current literature pertaining to monkeypox disease in terms of epidemiology, pathogenesis, manifestations, and outcomes. In order to ascertain the findings, this study adheres to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) checklist.

Data sources. Online databases of PubMed, Embase, Scopus, and Web of Science were considered as sources of data. We browsed the keywords in these databases and inquired all English literature up to December, 2022. The following is a prototype of search strategy we applied in PubMed by using Medical Subject Headings (MeSH). Search strategy of other resources is included in Supplemental material 1. The acronyms “ti” and “ab” stand for “title” and “abstract” respectively.

Study selection. We selected the literature in two steps. First, a group of five researchers screened and initially selected the studies based on pertinence of titles and abstracts. At the next step, seven researchers got through the full texts of these primarily selected studies. The fitting publications fulfilling the eligibility criteria of the study were opted in to advance to the next steps.

Being original, written in English language, peer reviewed prior to acceptance for publication were considered items of inclusion criteria for this study.

Studies in progress but without published data, non-human studies, duplicated publications, review papers, abstracts without available full texts, conference abstracts, editorial letters, case reports, and case series were excluded from our study.

Data extraction. Once the second step of selection process finalized and appropriate publications were included seven researchers explored the full texts and extracted the requisites for our study. These requisites consisted of first author's ID (reference), year and country of publication, type of studies, study population, gender and mean age of population, prevalence of disease, type and route of diagnostic testing, observed signs and symptoms, mortality rate, and summary of findings. Table 1 shows this data. To avoid any remaining duplications and overlaps the finally selected publications and extraction were checked out by other team members.

Quality and risk of bias assessment. In order to optimize the quality, this review study benefits from the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) checklist. To minimize any probable bias risk, we utilized the Newcastle–Ottawa Scale (NOS) risk assessment tool (Table 2). Worthy to mention that a total score of nine in three categories is calculated in this numerical bias assessment tool. These three categories include selection, comparability, and exposure/outcome. Numerical values of four, two, and three are attributed to these categories respectively.

Results

In the present review, the initial search identified a total of 5010 potential papers; after duplicates were removed, 2133 articles remained, and the titles and abstracts were reviewed for inclusion, leading to retrieval of 593 papers for assessment. An additional of 514 papers was excluded in the full-text screening stage, leaving a final pool of 79 papers that met inclusion criteria for the final review. Ultimately, after full-text papers were evaluated for selection criteria, 31 studies were included in our systematic review (Fig.).

The included studies were performed mostly in Democratic Republic of the Congo (DRC) ($n = 11$), followed by the USA ($n = 5$), Zaire ($n = 4$), Nigeria ($n = 3$), Liberia ($n = 1$), Sierra Leone ($n = 1$), UK ($n = 2$), Central African Republic ($n = 1$), Portugal ($n = 1$), Sudan ($n = 1$), and Spain ($n = 1$). Review of these studies revealed that rash, fever, chills, nausea, lymphadenopathy, mouth ulcer, sore throat, headache, pruritis, fatigue, sensitivity to light, and malaise are the most common symptoms of human monkeypox. The most prevalent symptoms are rash (ranging from 31% to 100%) and fever (ranging from 43% to 100%). The diagnosis was made using different assays, including PCR (mostly used), IHC, ELISA, culture, electron microscopy, western blot, hemagglutination-inhibition assay, radioimmunoassay (RIA), and the RIA adsorption.

The rate of hospitalization varied between 3.7% and 100%. A number of complications following the infection were reported including, but not limited to, encephalitis (mostly in children), septicemia,

bacterial cellulitis, retropharyngeal and parapharyngeal abscess, mouth ulcers, corneal scar, keratitis, unilateral conjunctivitis, bronchopneumonia, and pulmonary distress.

The mortality rate was between 0% and 23%. Jezek et al. observed no deaths in vaccinated group and 27 (11%) deaths among 250 unvaccinated patients. All deaths happened in patients aged between three months and eight years. The case–fatality rate was twice in patients aged 0–4 years compared to patients aged 5–9 years. The majority of deaths (55%) was occurred during the second week of the disease [27]. Pittman et al. reported the mortality rate of 80% (4 out of 5) among pregnant women [40].

The incidence rate of the infection was lower among women compared to men. Moreover, the incidence rate of the infection was lower among those who received the smallpox vaccine compared to those who did not receive the vaccine [53]. Several studies have investigated the attack rate of the virus. Jezek et al. evaluated second attack rate among 245 patients infected from an animal source. The overall second attack rate was 3%, which was more prominent in unvaccinated household contacts and those aged 0–4 years [25]. In another study, Jezek et al., found the attack rate of 7.2% and 0.9% for unvaccinated and vaccinated patients, respectively [26]. However, later, a study showed a much higher household attack rate (50%) [34].

Discussion

The rapid increase of monkeypox cases around the globe forced the World Health Organization (WHO) to declare it an outbreak to Immerse prompt attention toward this matter [19]. This rapid spreading demands preparation and collaboration at different levels, such as diagnosis, therapeutic, and preventive care to avoid another potential pandemic's emergence [31]. Herein, we tracked the course monkeypox since its discovery to deliver a picture of its pattern over time.

Epidemiology. Since the first discovery of monkeypox infection in humans in 1970, concerns have never been more profound, as it was particularly recognized to be endemic to West and central African countries [42]. and contrary to the current outbreak, monkeypox was rarely observed outside the African continent [50]. As of December 7, 110 countries have confirmed monkeypox infection, accounting for more than 82 000 diagnosed cases. Almost 99% of incidents occurred in locations with no history of reported monkeypox [13].

The incidence of monkeypox infection was significantly higher among men than women in our review. This is aligned with other studies: Bunge et al. evaluated that the presentation of monkeypox is 50 folds higher in males than females in most outbreaks in Africa and outside [6]. A systematic review by Beer et al. has also represented that 18 of 26 stud-

Table 1. Description of the findings reported in eligible studies

ID	Author (reference)	Year and country	Population	Gender	Mean age	Prevalence	Type and route of the test (for diagnosis)	Signs and symptoms n (%)												Complications	Mortality rate (%)	Other findings
								Rash	Fever	Nausea	Lymphadenopathy	Chills	Mouth ulcers	Sore throat	Headache	Pruritis	Fatigue	Sensitivity to light	Malaise			
1	CDC [9]	1997 DRC	419 total cases. That 344 cases had available data	55% male	Cases younger than 16 years of age composed 85% of the total cases	*	Fever, and a vesicular-pustular rash similar to a WHO reference photograph	31	98	-	69	-	50	63	-	-	-	-	11 diarrhea 41 cough	54% of the cases were incapacitated for more than 3 days	1.5	20 of the 344 cases (6%) had scar evidence of vaccinia vaccination and 19 reported a past history of chickenpox. 5 cases died (case-fatality rate 1.5%) within 3 weeks of rash onset and they ranged in age from 4 to 8 years. Two cases were found with corneal opacities and 6 with alopecia
2	CDC [11]	2003 USA	53 cases	49% male	Median = 26 (4-56) Data not available for 14 cases	*	PCR, IHC	83	73	20	47	37	-	33	-	-	-	Respiratory symptoms 64	26% of total have been hospitalized, including a child aged < 10 years with encephalitis		Primary route of transmission is from close contact with infected mammalian pets, but the possibility of human-to-human transmission cannot be excluded	
3	CDC [12]	July 8 2003 USA	71 cases	45% male	Median = 28 (1-51)	*	32 of 35 (91%) tested positive for monkeypox PCR, culture, IHC, and/or electron microscopy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26% were hospitalized; two patients, both children, had serious clinical illness (1-4); both have recovered		The median incubation period was 12 days (range: 1-31 days). 30 persons got vaccinated by smallpox vaccine (7 pre-exposure and 23 post-exposure) three (10%) reported rash within 2 weeks of vaccination. Only one was confirmed having monkeypox. All patients reported having contact with sick-pet prairie dogs		
4	Reed K.D. [41]	2004 USA	11 cases	45% male	range 3-43	*	3 suspected; 8 Laboratory-Confirmed; The culture was + in 7 patient; Pcr in 6 patient; EM in 3 patients and 1 patient only was diagnose by IHC	100	82	9	55	82	100	55	100	-	-	18	Sweat (82), persistent cough (73), pharyngitis (27), tonsillar hypertrophy (18), mild chest tightness	Four patients were hospitalized	0	6 (54%) had got the smallpox vaccine. In all cases, transmission was by direct contact with an infected prairie dog, however, possibility of person to person transmission can not be excluded. Incubation period have ranged from 4 to 24 days (median 15; mean 14.5)

Table 1. Description of the findings reported in eligible studies (continued)

ID	Author (reference)	Year and country	Population	Gender	Mean age	Prevalence	Type and route of the test (for diagnosis)	Signs and symptoms n (%)												Complications	Mortality rate (%)	Other findings
								Rash	Fever	Nausea	Lymphadenopathy	Chills	Mouth ulcers	Sore throat	Headache	Pruritis	Fatigue	Sensitivity to light	Malaise			
5	Nolen L.D. [35]	2016 DRC	104 cases, 63 during the focused investigation period (July–December 2013)	57.1% male	15.5 (4m–68y) Median = 10	*	50 (48.1%) laboratory-confirmed PCR	57.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.6	The median of household attack rate was 50%; mean was 52.1% (range 50–100%). The incubation period was 5–13 day for the central 75% of cases		
6	Adler H. [1]	2022 UK	11 cases	57% male	6 cases 30–40 and one under 2 yrs	*	PCR	100	43	0	45.5	0	18	-	-	-	-	-	0	All got hospitalized but full recovered. Mood disturbance, acute alcohol withdrawal, severe neuralgia, abscess, unilateral conjunctivitis		
7	Breman J.G. [5]	1980	47	55% male	Mean = 8 Median = 4 83% < 10 55% < 5	*	Virus isolation, electron microscopic (EM) serologic test culture	100	100	-	38	-	-	-	-	-	-	-	23	4 of the 47 patients (9%) had a vaccination scar 4 cases represented the person-to-person spread of monkeypox		
8	Doshi R.H. [15]	2020 DRC	223	69.5% male	11.64	*	PCR	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8 subjects reported smallpox vaccination, and there was no significant difference in rash severity according to the presence of vaccination scar [0.66 (95% CI: 0.13, 3.36)] Self-reported exposure to both rodents and non-human primates three weeks before the onset of rash was commonplace (91% and 77% for rodents and NHP, respectively)		

Table 1. Description of the findings reported in eligible studies (continued)

ID	Author (reference)	Year and country	Population	Gender	Mean age	Prevalence	Type and route of the test (for diagnosis)	Signs and symptoms n (%)												Complications	Mortality rate (%)	Other findings		
								Rash	Fever	Nausea	Lymphadenopathy	Chills	Mouth ulcers	Sore throat	Headache	Pruritis	Fatigue	Sensitivity to light	Malaise				Other signs and symptoms	
13	Huhn G.D. [21]	2003 USA	34	52.9% male	26 71% > 18 yrs	*	PCR	97	85	-	71	-	-	65	-	-	71	-	65	-	-	9 (26%) were hospitalized. Encephalopathy and retropharyngeal abscess in 2 young school-aged children	0	Previous smallpox vaccination was not associated with disease severity or hospitalization. 15% were defined as severely ill. Patients with ages < 18 yrs were more likely to be hospitalized in an intensive care unit. 19 cases (56%) have contact or been bitten by monkeypox-infected animal. The incubation period was 12 days. 7 patients (21%) had previous smallpox vaccination
14	Hutin Y.J. [22]	1997 DRC	88	56% male	Median = 10	2.16%	PCR, hemagglutination-inhibition assay, Western blot, and neutralization assay	100	-	-	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13 of 84 (15.5%) patients had vaccination scars. 73% of the case patients reported exposure to another patient or eating wild animals (incubation period 7–21 days)	
15	Inigo Martinez J. [23]	Spain 2022	595 508 cases investigated	99% male	Median = 35		PCR	98	63.8	-	61.2	-	31.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	225 (44.3%) patients had HIV infection. 56 (11%) patients were on pre-exposure prophylaxis treatment. 427 cases (84.1%) reported condomless sex or sex with multiple partners within 21 days before the onset of symptoms	

ID	Author (reference)	Year and country	Population	Gender	Mean age	Prevalence	Type and route of the test (for diagnosis)	Signs and symptoms n (%)												Complications	Mortality rate (%)	Other findings		
								Rash	Fever	Nausea	Lymphadenopathy	Chills	Mouth ulcers	Sore throat	Headache	Pruritis	Fatigue	Sensitivity to light	Malaise				Other signs and symptoms	
16	Jezeck Z. [24]	Zaire 1988	338	58% male	Mean = 6.9 Median = 4.4	*	haemagglutination inhibition, fluorescent antibody, ELISA, radioimmunoassay (RIA), and the RIA adsorption	100	-	-	-	62.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Secondary bacterial infection of skin: 48 (14.2%) Broncho-pneumonia, pulmonary distress: 34 (10%) Vomiting, diarrhoea, dehydration: 22 (6.5%) Keratitis, corneal ulceration: (3.25%) Septicaemia: (0.29%) Encephalitis: (0.29%)	9.8	43 patients (13%) had vaccination scar. 245 (72.5%) patients with animal source of infection and 93 (27.5%) patients with human source. Unilateral or bilateral blindness, weak vision and deforming scars
17	Jezeck Z. [25]	Zaire 1988	2278	52.1% female 47.9% male	-	93 (4.0%)	haemagglutination inhibition, the fluorescent antibody, ELISA, radioimmunoassay (RIA), and the RIA adsorption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Vaccination scar present: 1555. Vaccination scar present: 723. Attack rate in vaccinated people: 15 (0.96%). The rate of attack in non-vaccinated people: 54 (7.47%)	-	-
18	Jezeck Z. [26]	Zaire 1986	2510	-	-	62 (2.5%)	HAI, fluorescent antibody, ELISA, RIA, radioimmunoassay adsorption ELISA and ELISA-adsorption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Vaccination scar present: 1869. Vaccination scar present: 641. Attack rate in vaccinated people: 16 (0.9%). The rate of attack in non-vaccinated people: 46 (7.2%)	-	-

Table 1. Description of the findings reported in eligible studies (continued)

ID	Author (reference)	Year and country	Population	Gender	Mean age	Prevalence	Type and route of the test (for diagnosis)	Signs and symptoms n (%)												Complications	Mortality rate (%)	Other findings			
								Rash	Fever	Nausea	Lymphadenopathy	Chills	Mouth ulcers	Sore throat	Headache	Pruritis	Fatigue	Sensitivity to light	Malaise				Other signs and symptoms		
19	Jezek B.Z. [27]	Zaire, 1987	282	50.7% male	90% < 15 yrs	-	HA1 test, fluorescent-antibody test, ELISA, RIA and RIA adsorption test	100	100	-	80.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Secondary bacterial infection of the skin: 49 (17.37%) Bronchopneumonia, pulmonary distress: 30 (10.63%) Vomiting, diarrhea, dehydration marasmus: 17 (6.02%) Keratitis, corneal ulceration: 12 (4.25%) Septicemia: 1 (0.35%) Encephalitis: 1 (0.35%)	9.57	11% had visible smallpox vaccination scars. All deaths were from unvaccinated patients. All death occurred in those aged between 3 months and 8 years	
20	Kathán E. [28]	Central African Republic, 2018	26	53.8% male	Median = 24 (12 months–58 yrs)	0.49%	PCR	100	100	-	34.6	-	-	26.9	46.2	-	-	-	-	-	-	(61.5%) had been hospitalized	7.7	(19.2%) had the smallpox vaccination scar	
21	Ogoina D. [36]	2017 Nigeria	21	80.9% male	Median = 29 (6–45 yrs)	35%	PCR-tested	100	90.5	14.2	62	62	52.4	42.8	57	67	62	14.3	62	-	-	61.9% were hospitalized	0	There was concomitant chicken pox, syphilis and HIV-1 infections Majority of suspected cases were adults (80.9%)	
24	Reynolds M.G. [45]	2005 USA	30	43.3% male	25 yrs	*	combination of clinical symptoms, exposure information, and laboratory criteria of CDC	100	93	-	67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Got smallpox vaccine: 20%. 100% had exposure to prairie dog	-	-

ID	Author (reference)	Year and country	Population	Gender	Mean age	Prevalence	Type and route of the test (for diagnosis)	Signs and symptoms n (%)												Complications	Mortality rate (%)	Other findings								
								Rash	Fever	Nausea	Lymphadenopathy	Chills	Mouth ulcers	Sore throat	Headache	Pruritis	Fatigue	Sensitivity to light	Malaise				Other signs and symptoms							
25	Rimoin A.W. [47]	2010 DRC	Sankuru District	62.1% male	11.9	760	scab or vesicular fluid by PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Vaccine: 3%			
26	White-house E.R. [53]	2021 DRC	1057	53.7% male	Median = 14 range (1 months–79 yrs)	average annual incidence was 14.1 per 100 000	real-time PCR assay	100	99.4	24.8	84.7	89.0	56	-	78.4	59.3	86.3	83.2	75.3	-	-	-	-	-	-	-	9.2% cases received smallpox vaccine. The incidence was higher in men vs women. Animal and human contact as an only source of exposure was found in 36.9% and 33.3%, respectively			
27	Osadebe L. [37]	2017 DRC	Total = 752 Confirmed = 333	53% male	5.77 yrs	44.3%	real-time PCR	95.2	100	23	85	80	58.3	76	75.2	53	85	32.5	71.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
28	Pittman R.R. [40]	2022 DRC	214	63.9% male	14 Median = 13 (0–61)	-	PCR	96.8	-	-	57.4	97	24.5	78.2	23.6	-	85	-	85.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Fetal death happened in 4 of 5 (80%) patients who were pregnant at admission. 4 cases had vaccination history. Most signs an symptoms lasted 3–5 days

Table 1. Description of the findings reported in eligible studies (continued)

ID	Author (reference)	Year and country	Population	Gender	Mean age	Prevalence	Type and route of the test (for diagnosis)	Signs and symptoms n (%)												Complications	Mortality rate (%)	Other findings			
								Rash	Fever	Nausea	Lymphadenopathy	Chills	Mouth ulcers	Sore throat	Headache	Pruritis	Fatigue	Sensitivity to light	Malaise				Other signs and symptoms		
29	Reynolds M.G. [43]	2006 USA	Total = 47 Confirmed = 37	46.8% male				85	93	30	70	70			70	66									57% reported having exposure to MPXV in a home environment; contact with an ill pet. The remaining (43%) were all exposed in settings of occupational animal care. 17 individuals (36%) received a bite or scratch from an ill prairie dog in addition to other potential noninvasive exposures. Mean incubation period was 11.5 days approximately. 13 was in non-invasive exposure group
30	Rimoïn A.W. [46]	2007 DRC	51	48.52% male	mean = 10 Median = 7		PCR	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.73	recognized the causative agent for a rash-causing infection in 83% of all patients
31	Yinka-Ogunleye A. [58]	2019 Nigeria	122	69% male	27 Median = 29 (0–50 yrs)		real-time PCR	100	88	24	69	65	38	58	79	73	55	24	63					6	30% had contact with people who had similar lesions 10 patients reported contact with animals. 4 of the people who died had HIV with features of AIDS. The greatest affected parts were the face (in 68 [96%])

Table 2. Newcastle–Ottawa Scale (NOS) bias risk assessment of the study

ID	First author	Selection (out of 4)	Comparability (out of 2)	Exposure/Outcome (out of 3)	Total (out of 9)
1	CDC [9]	4	2	3	9
2	CDC [11]	4	2	3	9
3	CDC [12]	2	1	2	5
4	Reed K.D. [41]	4	1	3	8
5	Nolen L.D. [35]	3	2	2	7
6	Adler H. [1]	3	2	3	8
7	Breman J.G. [5]	3	2	3	8
8	Doshi R.H. [15]	2	1	2	5
9	Duque M.P. [38]	3	2	3	8
10	Formenty P. [16]	4	1	3	8
11	Foster S.O. [17]	3	2	2	7
12	Girometti N. [18]	4	2	3	9
13	Huhn G.D. [21]	4	2	3	9
14	Hutin Y.J. [22]	2	1	2	5
15	Inigo Martinez J. [23]	3	2	3	8
16	Jezek Z. [24]	3	2	3	8
17	Jezek Z. [25]	3	2	3	8
18	Jezek Z. [26]	2	1	2	5
19	Jezek B.Z. [27]	2	0	3	5
20	Kalthan E. [28]	2	1	1	4
21	Ogoina D. [36]	2	1	2	5
24	Reynolds M.G. [45]	2	0	3	5
25	Rimoin A.W. [47]	2	1	2	5
26	Whitehouse E.R. [53]	4	2	3	9
27	Osadebe L. [37]	2	1	2	5
28	Pittman R.R. [40]	4	2	2	8
29	Reynolds M.G. [43]	2	1	2	5
30	Rimoin A.W. [46]	2	1	3	6
31	Yinka-Ogunleye A. [58]	3	1	3	7

ies reported more frequency of male cases than female [3]. On the other hand, the transmission of disease through sexual contact in this outbreak has been relatively higher than in previous ones, mainly in men with homosexual behaviors [55]. Tarin-Vicente E.J. et al. recorded that 92% of patients were gay, bisexual, or men who had sex with other men, and most of them had no contact or recent travel to the endemic regions [48].

Smallpox vaccination status. The resurgence of monkeypox provoked controversies about the reasons behind it. One contributing factor in the post-smallpox era is the cessation of vaccination and declining efficacy of the vaccine (Vaccinia virus) in the older generation, which was held accountable for having a cross-protection against monkeypox [33]. An increase in the average age of cases in DRC (Democratic Republic of Congo) can support this hypothesis [20]. Bragazzi et al. reported that in endemic African and non-endemic regions, the incidence rate of monkeypox infection in smallpox-vaccinated subjects was significantly lower than in unvaccinated ones [4]. This is in line with the result of this article. Worth mentioning that one Italian case in his 30s was affected by monkeypox despite being vaccinated for smallpox [2].

Presentation. The characteristic features of monkeypox resemble smallpox. However, smallpox symptoms are often more severe, and lymphadenopathy is generally absent [39]. The most prevalent symptoms described in reviewed articles are rash and fever, ranging from 31–100% and 43–100%, respectively. However, other symptoms were reported, such as lymphadenopathy, chills, nausea, mouth ulcer, headache, sore throat, pruritus, fatigue, and light sensitivity. Different studies claimed the atypical manifestation of monkeypox in the current outbreak (2022). Although the rash is still present, the involved areas are more localized and limited, with mild or absent prodromal symptoms, including lymphadenopathy, fever, and often other non-specific symptoms such as headache, malaise, and muscle pains [10, 51].

Complications. The rate and time frame of developing complications in monkeypox-infected individuals have not been scientifically determined [44]. Yet, a rare portion of this community can be affected by complications such as conjunctivitis/keratitis, bacterial superinfection, encephalitis, and pneumonitis [14, 46]. As anticipated, the reported complications in reviewed articles are in line with previous works. Moreover, septicemia, pharyngeal abscesses, and corneal scars have also been reported.

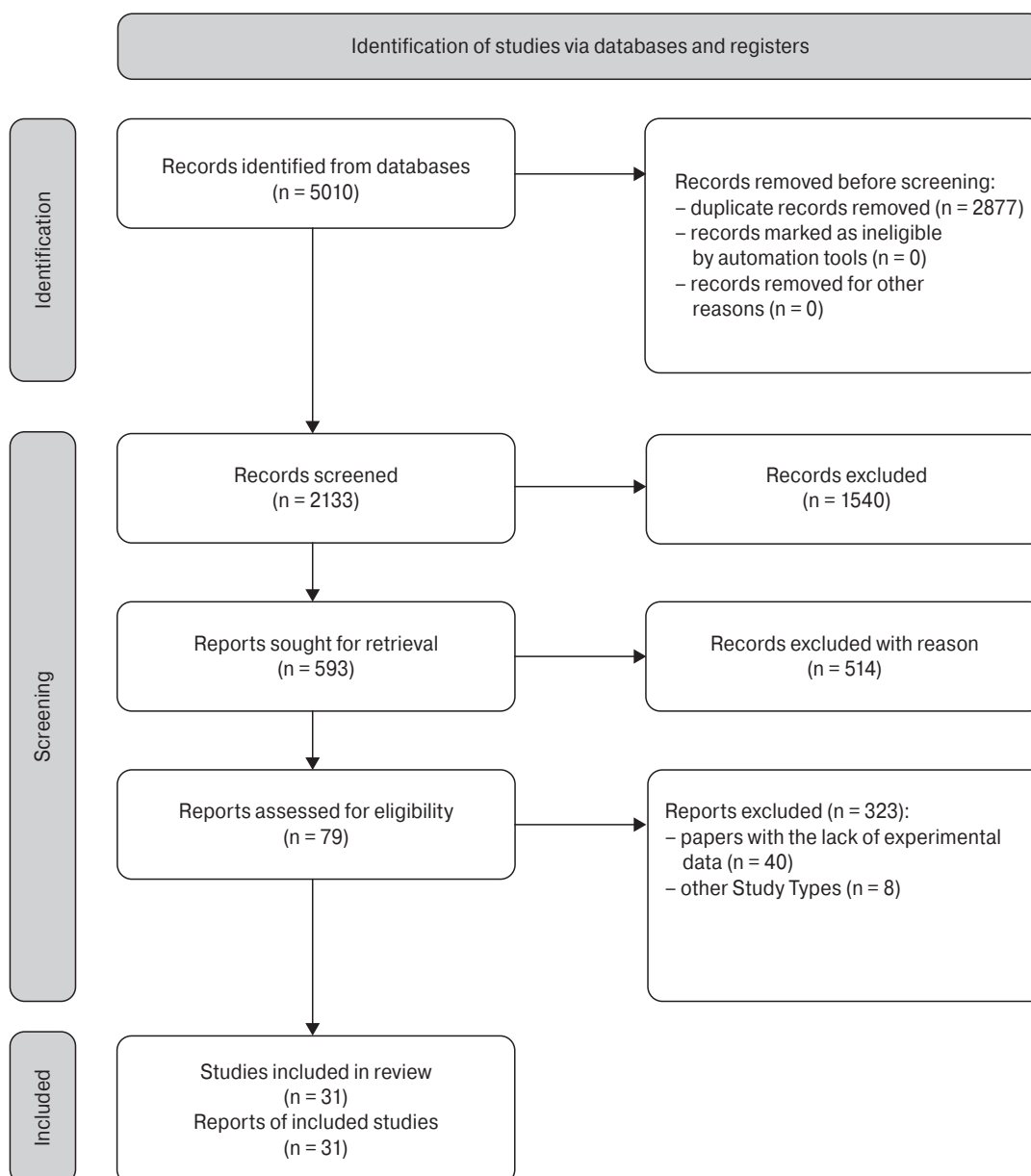


Figure. PRISMA 2020 flow diagram of study retrieval process

Case Hospitalization Rate (CHR), Case Fatality Rate (CFR), and attack rate. Dewitt et al. systematically reviewed monkeypox-related studies from 1950 to 2022. As they declared, Combined CHR was estimated to be 14.1%. Additional analysis during the pre-2017, 2017–2021, and 2022 outbreaks indicates CHRs of 49.8%, 21.7%, and 5.8%, respectively. CFR was estimated to be 0.03%. However, studies have high levels of heterogeneity [13]. The CHR ranged from 3.7% to 100% within our research articles. Also, the CFR was between 0% and 23%. However, in one report, all the demises were under eight years old, with a majority rate in the second week of the disease [27].

The attack rate of the monkeypox virus was significantly higher in unvaccinated individuals. Previous studies achieved different attack rates in the period of each outbreak. For instance, it estimated

9–12% of unvaccinated contacts within households in the Africa outbreak; thus, in the US outbreak, it was 0% [49, 58]. Although some epidemiological links between cases are reported, no transmission with non-sexual contacts has been yet documented in this outbreak.

The contagiousness and severity of any infectious disease can alter by genetic evolution. Only 2 known clades of monkeypox are responsible for all cases [19] Although it is a gray area and needs further investigation, some studies have shown that genetic variations might intensify the disease's transmissibility [29].

Strengths and limitations. Our work faces the inherent limitations of all systematic reviews, which include the risk of selection bias, attrition bias, and selective outcome reporting as well as clinical or statistical heterogeneity. In order to mitigate such

risks, we diligently followed the PRISMA guidelines for systematic reviews, and we quantified the risk of bias using the Newcastle–Ottawa Scale (NOS) risk assessment tool. In this way, we were able to provide an updated, comprehensive, systematic as well as methodologically solid overview of the current literature on our chosen topic.

Suggestions/future implications. It is of outmost importance — especially in high-risk countries — to early detect and promptly diagnose individuals infected by the monkeypox virus. Future implications of our work will hopefully pave the way for large population studies aimed at defining the incidence, prevalence, and attack rate of the infection on a more granular as well as extensive level. Further investigations are also required to elucidate symptoms onset and pathophysiology of the infection in different age, sex, and socioeconomic strata of the population, as well as in patients with pre-existing comorbidities and specific viral infections (e.g., HIV, HBV, HCV, etc).

Conclusion

In conclusion, we performed a systematic review of 31 published studies on the epidemiology, pathogenesis, manifestations, and outcomes of monkeypox. We elucidated the most common symptoms as well as complications, amongst which death usually occurs during the second week of the disease manifestation. Further studies are needed to elucidate

the natural history of the disease in various patients' populations, as well as detailing the monkeypox attack rate.

Additional information

Ethics approval and consent to participate: Not applicable.

Consent for publication. Not applicable.

Availability of data and materials. The authors stated that all information provided in this article could be shared.

Supplementary materials are available at: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-MAS-15632>.

Competing interests. The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

Funding. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors' contributions. SA.SA. and E.M. and S.J. designed of the study. AM.A. A.A. R.S. wrote the methodology. SS.T., S.V., M.D., A.G., Z.P., P.P., S.N.P., A.S., S.A., P.P., G.A., M.J., H.E., Z.P., and A.K. wrote the main manuscript text and E.M. prepared figures All authors reviewed the manuscript.

Acknowledgements. The present study was conducted in collaboration with Khalkhal University of Medical Sciences, Iranian Research Center for HIV/AIDS, Tehran University of Medical Sciences and Tufts University School of Medicine.

References

- Adler H., Gould S., Hine P., Snell L.B., Wong W., Houlihan C.F., Osborne J.C., Rampling T., Beadsworth M.B., Duncan C.J., Dunning J., Fletcher T.E., Hunter E.R., Jacobs M., Khoo S.H., Newsholme W., Porter D., Porter R.J., Ratcliffe L., Schmid M.L., Semple M.G., Tunbridge A.J., Wingfield T., Price N.M.; NHS England High Consequence Infectious Diseases (Airborne) Network. Clinical features and management of human monkeypox: a retrospective observational study in the UK. *Lancet Infect Dis.*, 2022, vol. 22, no. 8, pp. 1153–1162. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00228-6
- Antinori A., Mazzotta V., Vita S., Carletti F., Tacconi D., Lapini L.E., D'Abramo A., Cicalini S., Lapa D., Pittalis S., Puro V., Rivano Capparuccia M., Giombini E., Gruber C.E.M., Garbuglia A.R., Marani A., Vairo F., Girardi E., Vaia F., Nicastrì E.; INMI Monkeypox Group. Epidemiological, clinical and virological characteristics of four cases of monkeypox support transmission through sexual contact, Italy, May 2022. *Euro Surveill.*, 2022, vol. 27, no. 22: 2200421. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.22.2200421
- Beer E.M., Rao V.B. A systematic review of the epidemiology of human monkeypox outbreaks and implications for outbreak strategy. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2019, vol. 13, no. 10: e0007791. doi: 10.1371/journal.pntd.0007791
- Bragazzi N.L., Kong J.D., Mahroum N., Tsigalou C., Khamisy-Farah R., Converti M., Wu J. Epidemiological trends and clinical features of the ongoing monkeypox epidemic: a preliminary pooled data analysis and literature review. *J. Med. Virol.*, 2023, vol. 95, no. 1: e27931. doi: 10.1002/jmv.27931
- Breman J.G., Kalisa-Ruti, Steniowski M.V., Zanutto E., Gromyko A.I., Arita I. Human monkeypox, 1970–79. *Bull. World Health Organ.*, 1980, vol. 58, no. 2, pp. 165–182.
- Bunge E.M., Hoet B., Chen L., Lienert F., Weidenthaler H., Baer L.R., Steffen R. The changing epidemiology of human monkeypox — a potential threat? A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2022, vol. 16, no. 2: e0010141. doi: 10.1371/journal.pntd.0010141
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2022–2023 Mpox Outbreak Global Map. URL: <https://www.cdc.gov/poxvirus/mpox/response/2022/world-map.html> (25.10.2023)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). About Mpox. URL: <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/about.html> (10.10.2023)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Human monkeypox — Kasai Oriental, Democratic Republic of Congo, February 1996–October 1997. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 1997, vol. 46, no. 49, pp. 1168–1171.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Monkeypox Virus Infection in the United States and Other Non-endemic Countries — 2022. URL: <https://emergency.cdc.gov/han/2022/han00466.asp> (25.10.2023)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of monkeypox — Illinois, Indiana, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2003, vol. 52, no. 23, pp. 537–540.

12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: multistate outbreak of monkeypox — Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2003, vol. 52, no. 27, pp. 642–646.
13. DeWitt M.E., Polk C., Williamson J., Shetty A.K., Passaretti C.L., McNeil C.J., Fairman R.T., Sampson M.M., Dalton C., Sanders J.W. Global monkeypox case hospitalisation rates: a rapid systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*, 2022, vol. 54: 101710. doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101710
14. Di Giulio D.B., Eckburg P.B. Human monkeypox: an emerging zoonosis. *Lancet Infect. Dis.*, 2004, vol. 4, no. 1, pp. 15–25. doi: 10.1016/s1473-3099(03)00856-9
15. Doshi R.H., Alfonso V.H., Morier D., Hoff N.A., Sinai C., Mulembakani P., Kisalu N., Cheng A., Ashbaugh H., Gadot A., Cowell B., Okitolonda E.W., Muyembe-Tamfum J.J., Rimoin A.W. Monkeypox rash severity and animal exposures in the Democratic Republic of the Congo. *Ecohealth*, 2020, vol. 17, no. 1, pp. 64–73. doi: 10.1007/s10393-019-01459-7
16. Formenty P., Muntasir M.O., Damon I., Chowdhary V., Opoka M.L., Monimart C., Mutasim E.M., Manuguerra J.C., Davidson W.B., Karem K.L., Cabeza J., Wang S., Malik M.R., Durand T., Khalid A., Rioton T., Kuong-Ruay A., Babiker A.A., Karsani M.E., Abdalla M.S. Human monkeypox outbreak caused by novel virus belonging to Congo Basin clade, Sudan, 2005. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010, vol. 16, no. 10, pp. 1539–1545. doi: 10.3201/eid1610.100713
17. Foster S.O., Brink E.W., Hutchins D.L., Pifer J.M., Lourie B., Moser C.R., Cummings E.C., Kuteyi O.E., Eke R.E., Titus J.B., Smith E.A., Hicks J.W., Foege W.H. Human monkeypox. *Bull. World Health Organ.*, 1972, vol. 46, no. 5, pp. 569–576.
18. Girometti N., Byrne R., Bracchi M., Heskin J., McOwan A., Tittle V., Gedela K., Scott C., Patel S., Gohil J., Nugent D., Suchak T., Dickinson M., Feeney M., Mora-Peris B., Stegmann K., Plaha K., Davies G., Moore L.S.P., Mughal N., Asboe D., Boffito M., Jones R., Whitlock G. Demographic and clinical characteristics of confirmed human monkeypox virus cases in individuals attending a sexual health centre in London, UK: an observational analysis. *Lancet Infect. Dis.*, 2022, vol. 22, no. 9, pp. 1321–1328. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00411-X
19. Guarner J., Del Rio C., Malani P.N. Monkeypox in 2022 — What clinicians need to know. *JAMA*, 2022, vol. 328, no. 2, pp. 139–140. doi: 10.1001/jama.2022.10802
20. Heymann D.L., Szczeniowski M., Esteves K. Re-emergence of monkeypox in Africa: a review of the past six years. *Br. Med. Bull.*, 1998, vol. 54, no. 3, pp. 693–702. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a011720
21. Huhn G.D., Bauer A.M., Yorita K., Graham M.B., Sejvar J., Likos A., Damon I.K., Reynolds M.G., Kuehnert M.J. Clinical characteristics of human monkeypox, and risk factors for severe disease. *Clin. Infect. Dis.*, 2005, vol. 41, no. 12, pp. 1742–1751. doi: 10.1086/498115
22. Hutin Y.J., Williams R.J., Malfait P., Pebody R., Loparev V.N., Ropp S.L., Rodriguez M., Knight J.C., Tshioko F.K., Khan A.S., Szczeniowski M.V., Esposito J.J. Outbreak of human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 1996 to 1997. *Emerg. Infect. Dis.*, 2001, vol. 7, no. 3, pp. 434–438. doi: 10.3201/eid0703.010311
23. Iñigo Martínez J., Gil Montalbán E., Jiménez Bueno S., Martín Martínez F., Nieto Juliá A., Sánchez Díaz J., García Marín N., Córdoba Deorador E., Nunziata Forte A., Alonso García M., Humanes Navarro A.M., Montero Morales L., Domínguez Rodríguez M.J., Carbajo Ariza M., Díaz García L.M., Mata Pariente N., Rumayor Zarzuelo M., Velasco Rodríguez M.J., Aragón Peña A., Rodríguez Baena E., Miguel Benito Á., Pérez Meixeira A., Ordobás Gavín M., Lopaz Pérez M.Á., Arce Arnáez A. Monkeypox outbreak predominantly affecting men who have sex with men, Madrid, Spain, 26 April to 16 June 2022. *Euro Surveill.*, 2022, vol. 27, no. 27: 2200471. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.27.2200471
24. Jezek Z., Grab B., Szczeniowski M., Paluku K.M., Mutombo M. Clinico-epidemiological features of monkeypox patients with an animal or human source of infection. *Bull. World Health Organ.*, 1988, vol. 66, no. 4, pp. 459–464.
25. Jezek Z., Grab B., Szczeniowski M.V., Paluku K.M., Mutombo M. Human monkeypox: secondary attack rates. *Bull. World Health Organ.*, 1988, vol. 66, no. 4, pp. 465–470.
26. Jezek Z., Marennikova S.S., Mutumbo M., Nakano J.H., Paluku K.M., Szczeniowski M. Human monkeypox: a study of 2,510 contacts of 214 patients. *J. Infect. Dis.*, 1986, vol. 154, no. 4, pp. 551–555. doi: 10.1093/infdis/154.4.551
27. Jezek Z., Szczeniowski M., Paluku K.M., Mutombo M. Human monkeypox: clinical features of 282 patients. *J. Infect. Dis.*, 1987, vol. 156, no. 2, pp. 293–298. doi: 10.1093/infdis/156.2.293
28. Kalthan E., Tenguere J., Ndjapou S.G., Koyazengbe T.A., Mbomba J., Marada R.M., Rombebe P., Yangueme P., Babamingui M., Sambella A., Nakoune E.R. Investigation of an outbreak of monkeypox in an area occupied by armed groups, Central African Republic. *Med. Mal. Infect.*, 2018, vol. 48, no. 4, pp. 263–268. doi: 10.1016/j.medmal.2018.02.010
29. Kugelman J.R., Johnston S.C., Mulembakani P.M., Kisalu N., Lee M.S., Koroleva G., McCarthy S.E., Gestole M.C., Wolfe N.D., Fair J.N., Schneider B.S., Wright L.L., Huggins J., Whitehouse C.A., Wemakoy E.O., Muyembe-Tamfum J.J., Hensley L.E., Palacios G.F., Rimoin A.W. Genomic variability of monkeypox virus among humans, Democratic Republic of the Congo. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, vol. 20, no. 2, pp. 232–239. doi: 10.3201/eid2002.130118
30. Learned L.A., Reynolds M.G., Wassa D.W., Li Y., Olson V.A., Karem K., Stempora L.L., Braden Z.H., Kline R., Likos A., Libama F., Moudzeo H., Bolanda J.D., Tarangonia P., Boumandoki P., Formenty P., Harvey J.M., Damon I.K. Extended inter-human transmission of monkeypox in a hospital community in the Republic of the Congo, 2003. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2005, vol. 73, no. 2, pp. 428–434.
31. Li J.Y., You Z., Wang Q., Zhou Z.J., Qiu Y., Luo R., Ge X.Y. The epidemic of 2019-novel-coronavirus (2019-nCoV) pneumonia and insights for emerging infectious diseases in the future. *Microbes. Infect.*, 2020, vol. 22, no. 2, pp. 80–85. doi: 10.1016/j.micinf.2020.02.002
32. Marennikova S.S., Seluhina E.M., Mal'ceva N.N., Cimiskjan K.L., Macevic G.R. Isolation and properties of the causal agent of a new variola-like disease (monkeypox) in man. *Bull. World Health Organ.*, 1972, vol. 46, no. 5, pp. 599–611.
33. Mehraeen E., Salehi M.A., Behnezhad F., Moghaddam H.R., SeyedAlinaghi S. Transmission modes of COVID-19: a systematic review. *Infect. Disord. Drug Targets*, 2021, vol. 21, no. 6: e170721187995. doi: 10.2174/1871526520666201116095934
34. Nguyen P.Y., Ajisegiri W.S., Costantino V., Chughtai A.A., MacIntyre C.R. Reemergence of human monkeypox and declining population immunity in the context of urbanization, Nigeria, 2017–2020. *Emerg. Infect. Dis.*, 2021, vol. 27, no. 4, pp. 1007–1014. doi: 10.3201/eid2704.203569

35. Nolen L.D., Osadebe L., Katomba J., Likofata J., Mukadi D., Monroe B., Doty J., Hughes C.M., Kabamba J., Malekani J., Bomponda P.L., Lokota J.I., Balilo M.P., Likafi T., Lushima R.S., Ilunga B.K., Nkawa F., Pukuta E., Karhemere S., Tamfum J.J., Nguete B., Wemakoy E.O., McCollum A.M., Reynolds M.G. Extended human-to-human transmission during a monkeypox outbreak in the Democratic Republic of the Congo. *Emerg. Infect. Dis.*, 2016, vol. 22, no. 6, pp. 1014–1021. doi: 10.3201/eid2206.150579
36. Ogoina D., Izibewule J.H., Ogunleye A., Ederiane E., Anebonam U., Neni A., Oyeyemi A., Etebu E.N., Ihekweazu C. The 2017 human monkeypox outbreak in Nigeria—Report of outbreak experience and response in the Niger Delta University Teaching Hospital, Bayelsa State, Nigeria. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 4: e0214229. doi: 10.1371/journal.pone.0214229
37. Osadebe L., Hughes C.M., Shongo Lushima R., Kabamba J., Nguete B., Malekani J., Pukuta E., Karhemere S., Muyembe Tamfum J.J., Wemakoy Okitolonda E., Reynolds M.G., McCollum A.M. Enhancing case definitions for surveillance of human monkeypox in the Democratic Republic of Congo. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2017, vol. 11, no. 9: e0005857. doi: 10.1371/journal.pntd.0005857
38. Perez Duque M., Ribeiro S., Martins J.V., Casaca P., Leite P.P., Tavares M., Mansinho K., Duque L.M., Fernandes C., Cordeiro R., Borrego M.J., Pelerito A., de Carvalho I.L., Nuncio S., Manageiro V., Minetti C., Machado J., Haussig J.M., Croci R., Spiteri G., Casal A.S., Mendes D., Souto T., Pocinho S., Fernandes T., Firme A., Vasconcelos P., Freitas G. Ongoing monkeypox virus outbreak, Portugal, 29 April to 23 May 2022. *Euro Surveill.*, 2022, vol. 27, no. 22: 2200424. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.22.2200424
39. Petersen E., Kantele A., Koopmans M., Asogun D., Yinka-Ogunleye A., Ihekweazu C., Zumla A. Human monkeypox: epidemiologic and clinical characteristics, diagnosis, and prevention. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 2019, vol. 33, no. 4, pp. 1027–1043. doi: 10.1016/j.idc.2019.03.001
40. Pittman P.R., Martin J.W., Kingebeni P.M., Tamfum J.J., Wan Q., Reynolds M.G., Quinn X., Norris S., Townsend M.B., Satheshkumar P.S., Soltis B. Clinical characterization of human monkeypox infections in the Democratic Republic of the Congo. *MedRxiv*, 2022.05.26.22273379. doi: 10.1101/2022.05.26.22273379
41. Reed K.D., Melski J.W., Graham M.B., Regnery R.L., Sotir M.J., Wegner M.V., Kazmierczak J.J., Stratman E.J., Li Y., Fairley J.A., Swain G.R., Olson V.A., Sargent E.K., Kehl S.C., Frace M.A., Kline R., Foldy S.L., Davis J.P., Damon I.K. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *N. Engl. J. Med.*, 2004, vol. 350, no. 4, 342–350. doi: 10.1056/NEJMoa032299
42. Reynolds M.G., Damon I.K. Outbreaks of human monkeypox after cessation of smallpox vaccination. *Trends Microbiol.*, 2012, vol. 20, no. 2, pp. 80–87. doi: 10.1016/j.tim.2011.12.001
43. Reynolds M.G., Davidson W.B., Curns A.T., Conover C.S., Huhn G., Davis J.P., Wegner M., Croft D.R., Newman A., Obiesie N.N., Hansen G.R., Hays P.L., Pontones P., Beard B., Teclaw R., Howell J.F., Braden Z., Holman R.C., Karem K.L., Damon I.K. Spectrum of infection and risk factors for human monkeypox, United States, 2003. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, vol. 13, no. 9, pp. 1332–1339. doi: 10.3201/eid1309.070175
44. Reynolds M.G., McCollum A.M., Nguete B., Shongo Lushima R., Petersen B.W. Improving the care and treatment of monkeypox patients in low-resource settings: applying evidence from contemporary biomedical and smallpox biodefense research. *Viruses*, 2017, vol. 9, no. 12: 380. doi: 10.3390/v9120380
45. Reynolds M.G., Yorita K.L., Kuehnert M.J., Davidson W.B., Huhn G.D., Holman R.C., Damon I.K. Clinical manifestations of human monkeypox influenced by route of infection. *J. Infect. Dis.*, 2006, vol. 194, no. 6, pp. 773–780. doi: 10.1086/505880
46. Rimoin A.W., Kusalu N., Kebela-Ilunga B., Mukaba T., Wright L.L., Formenty P., Wolfe N.D., Shongo R.L., Tshioko F., Okitolonda E., Muyembe J.J., Ryder R., Meyer H. Endemic human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001–2004. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, vol. 13, no. 6, pp. 934–937. doi: 10.3201/eid1306.061540
47. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kusalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 37, pp. 16262–16267. doi: 10.1073/pnas.1005769107
48. Tarín-Vicente E.J., Alemany A., Agud-Dios M., Ubals M., Suñer C., Antón A., Arando M., Arroyo-Andrés J., Calderón-Lozano L., Casañ C., Cabrera J.M., Coll P., Descalzo V., Folgueira M.D., García-Pérez J.N., Gil-Cruz E., González-Rodríguez B., Gutiérrez-Collar C., Hernández-Rodríguez Á., López-Roa P., de Los Ángeles Meléndez M., Montero-Menárguez J., Muñoz-Gallego I., Palencia-Pérez S.I., Paredes R., Pérez-Rivilla A., Piñana M., Prat N., Ramirez A., Rivero Á., Rubio-Muñoz C.A., Vall M., Acosta-Velásquez K.S., Wang A., Galván-Casas C., Marks M., Ortiz-Romero P.L., Mitjà O. Clinical presentation and virological assessment of confirmed human monkeypox virus cases in Spain: a prospective observational cohort study. *Lancet*, 2022, vol. 400, no. 10353, pp. 661–669. doi: 10.1016/S0140-6736(22)01436-2
49. Tegnell A., Van Loock F., Baka A., Wallyn S., Hendriks J., Werner A., Gouvras G. Development of a matrix to evaluate the threat of biological agents used for bioterrorism. *Cell Mol. Life Sci.*, 2006, vol. 63, no. 19–20, pp. 2223–2228. doi: 10.1007/s00018-006-6310-5
50. Thornhill J.P., Antinori A., Orkin C.M. Monkeypox virus infection across 16 countries — April–June 2022. Reply. *N. Engl. J. Med.*, 2022, vol. 387, no. 25: e69. doi: 10.1056/NEJMc2213969
51. Titanji B.K., Tegomoh B., Nematollahi S., Konomos M., Kulkarni P.A. Monkeypox: a contemporary review for healthcare professionals. *Open Forum Infect. Dis.*, 2022, vol. 9, no. 7: ofac310. doi: 10.1093/ofid/ofac310
52. Von Magnus P., Andersen E.K., Petersen K.B., Birch-Andersen A. A pox-like disease in cynomolgus monkeys. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1959, vol. 46, no. 2, pp. 156–176. doi: 10.1111/j.1699-0463.1959.tb00328.x
53. Whitehouse E.R., Bonwitt J., Hughes C.M., Lushima R.S., Likafi T., Nguete B., Kabamba J., Monroe B., Doty J.B., Nakazawa Y., Damon I., Malekani J., Davidson W., Wilkins K., Li Y., Radford K.W., Schmid D.S., Pukuta E., Muyamuna E., Karhemere S., Tamfum J.M., Okitolonda E.W., McCollum A.M., Reynolds M.G. Clinical and epidemiological findings from enhanced monkeypox surveillance in Tshuapa Province, Democratic Republic of the Congo During 2011–2015. *J. Infect. Dis.*, 2021, vol. 223, no. 11, pp. 1870–1878. doi: 10.1093/infdis/jiab133

54. WHO. Mpox (monkeypox) outbreak 2022. URL: [https://www.who.int/emergencies/situations/monkeypox-oubreak-2022\(10.10.2023\)](https://www.who.int/emergencies/situations/monkeypox-oubreak-2022(10.10.2023))
55. WHO. Mpox (monkeypox). URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/monkeypox\(10.10.2023\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/monkeypox(10.10.2023))
56. WHO. Multi-country outbreak of monkeypox. External situation report #1—6 July 2022. URL: [https://www.who.int/publications/m/item/multi-country-outbreak-of-monkeypox--external-situation-report--1---6-july-2022\(10.10.2023\)](https://www.who.int/publications/m/item/multi-country-outbreak-of-monkeypox--external-situation-report--1---6-july-2022(10.10.2023))
57. WHO. Weekly Bulletin on Outbreaks and Other Emergencies. Week 27: 27 June – 3 July 2022. URL: [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/359281/OEW27-270603072022.pdf\(10.10.2023\)](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/359281/OEW27-270603072022.pdf(10.10.2023))
58. Yinka-Ogunleye A., Aruna O., Dalhat M., Ogoina D., McCollum A., Disu Y., Mamadu I., Akinpelu A., Ahmad A., Burga J., Ndoreraho A., Nkuzimana E., Manneh L., Mohammed A., Adeoye O., Tom-Aba D., Silenou B., Ipadeola O., Saleh M., Adeyemo A., Nwadiutor I., Aworabhi N., Uke P., John D., Wakama P., Reynolds M., Mauldin M.R., Doty J., Wilkins K., Musa J., Khalakdina A., Adedeji A., Mba N., Ojo O., Krause G., Ihekweazu C.; CDC Monkeypox Outbreak Team. Outbreak of human monkeypox in Nigeria in 2017-18: a clinical and epidemiological report. *Lancet Infect. Dis.*, 2019, vol .19, no. 8, pp. 872–879. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30294-4

Авторы:

СейедАлиаги С., магистр философии, кандидат наук, клинический эпидемиолог, доцент, зам. руководителя по исследовательской деятельности Иранского исследовательского центра по ВИЧ/СПИД, Иранский институт снижения рискованного поведения, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;

Афсахи А.М., доктор философии, кафедра радиологии, медицинский факультет Калифорнийского университета, Сан-Диего, Калифорния, США;

Афзалиян А., врач, медицинский факультет Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;

Шахиди Р., врач, медицинский факультет Бушерского университета медицинских наук, г. Бушер, Иран;

Тамехри-заде С.С. студент медицинского факультета Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;

Варшочи С., студент медицинского факультета Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;

Дашти М., врач, кафедра радиологии Тегеранского университета медицинских наук, г. Тегеран, Иран;

Гасемзаде А., врач, кафедра радиологии Тегеранского университета медицинских наук, г. Тегеран, Иран;

Пашай А., аспирант, факультет сестринского дела Университета Британской Колумбии, г. Ванкувер, Канада;

Паранджху П., магистр общественного здравоохранения, научный сотрудник Турпанджянского колледжа медицинских наук Американского университета Армении, Ереван;

Пармун Э., студент медицинского факультета Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;

Парихани С.Н., бакалавр сестринского дела, медицинский факультет Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;

Шамсабади А., доктор философии, доцент кафедры информационных технологий здравоохранения, факультет медицинских наук Эсфарайен, Эсфарайен, Иран;

Ахмади С., врач, медицинский факультет Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;

Пезешги П., студент медицинского факультета Университета медицинских наук Мараге, Мараге, Иран;

Арджманд Г., студент медицинского факультета Университета медицинских наук Шахида Бехешти, Тегеран, Иран;

Джавахериан М., студент кафедры физиотерапии, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;

Эбрахими Х., студент медицинского факультета Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;

Карими А., врач, медицинский факультет Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;

Мехрани Э., кандидат наук, ассистент кафедры медицинских информационных технологий Халхальского медицинского университета, г. Халхал, Иран;

Джаханфар Ш., доктор философии, доцент, программа магистра, кафедра здравоохранения и общественной медицины, медицинский факультет Университета Тафтса, Бостон, США.

Authors:

SeyedAlinaghi S., MD, MPhil, PhD, Clinical Epidemiologist, Associate Professor, Research Deputy of Iranian Research Center for HIV/AIDS (IRCHA), Iranian Institute for Reduction of High-Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Afsahi A.M., MD, PhD, Department of Radiology, School of Medicine, University of California, San Diego (UCSD), California, USA;

Afzalian A., MD, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Shahidi R., MD, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran;

Tamehri Zadeh S.S., MD, Student, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Varshochi S., MD, Student, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Dashti M., MD, Department of Radiology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran;

Ghasemzadeh A., MD, Department of Radiology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran;

Pashaei A., PhD Student, School of Nursing, University of British Columbia, Vancouver, Canada;

Paranjkhoo P., MD, MPH, Researcher, Turpanjian College of Health Sciences, American University of Armenia, Yerevan, Armenia;

Parmoon Z., MD, Student, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Parikhani S.N., BS in Nursing, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Shamsabadi A., PhD, Assistant Professor, Department of Health Information Technology, Esfarayen Faculty of Medical Sciences, Esfarayen, Iran;

Ahmadi S., MD, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Pezezhgi P., MD, Student, School of Medicine, Maragheh University of Medical Sciences, Maragheh, Iran;

Arjmand G., MD, Student, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Javaherian M., MD, Student, Department of Physiotherapy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Ebrahimi H., MD, Student, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Karimi A., MD, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Mehraeen E., PhD, Assistant Professor, Department of Health Information Technology, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran;

Jahanfar S., PhD, Associate Professor, MPH Program, Department of Public Health and Community Medicine, Tufts University School of Medicine, Boston, USA.

ИЗУЧЕНИЕ КАТАЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОСИМБИОНТОВ ЖЕНСКОГО РЕПРОДУКТИВНОГО ТРАКТА ХРОНОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

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

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

Резюме. Каталаза — гемсодержащий фермент, относящийся к факторам защиты, разрушающий перекисные соединения. Наличие каталазной активности является важной способностью микроорганизмов, позволяющей им защищаться от неблагоприятных факторов, а также адаптироваться в условиях макроорганизма. Каталаза наряду с супероксиддисмутазой играют важную роль в устойчивости патогенов к кислородзависимым бактерицидным механизмам фагоцитов. Целью исследования являлось изучение каталазной активности микросимбионтов женского репродуктивного тракта при нормоценозе и кандидозном дисбиозе хронобиологическим методом. Исследование проводили на клинических изолятах, выделенных из микросимбиоценозов женского репродуктивного тракта. Активность каталазы определяли спектрофотометрическим методом по убыли пероксида водорода в течение суток с 3-часовым интервалом в зимнее время года. Динамику изменения каталазной активности оценивали с 3–5-кратным повторением условий эксперимента. У отдельных видов молочнокислых бактерий обнаружена каталаза, не содержащая гемовой группы — псевдокаталаза. Хронобиологический метод позволил выявить активность фермента у всех микросимбионтов. Доминантная и ассоциативная микробиота, выделенная от здоровых женщин, характеризовалась циркадианными (околосуточными) ритмами каталазной активности в ранние утренние часы — 5:00 ($p < 0,05$). Перекись водорода разлагается спонтанно или с участием неферментативных катализаторов, и микроорганизмы справляются с ней в этих условиях. У микросимбионтов, характерных для дисбиоза женского репродуктивного тракта и обычно обнаруживаемых в большом количестве на фоне снижения *Lactobacillus* spp., регистрировались ультрадианные ритмы с 12- и 8- часовыми гармониками каталазной активности с акрофазой в утренние и вечерние часы (8:00; 20:00). Минимальные значения продукции фермента у всех культур фиксировались в 12:00 и 17:00 часов. Таким образом, вклад ритма изучаемого показателя при различной степени чистоты влагиалища отражает адаптационные возможности патогенов к условиям существования и может лежать в основе при изучении механизмов их регуляции. Мезор и амплитудно-фазовая стабильность являются универсальными ритмометрическими параметрами, оценивающими состояние пациента и не зависящими от видовой принадлежности культуры.

Ключевые слова: каталазная активность, хронобиологический метод, ритмометрические параметры, нормоценоз, дисбиоз, *Lactobacillus* spp.

Адрес для переписки:

Николенко Марина Викторовна
625023, Россия, г. Тюмень, ул. Одесская, 54,
Тюменский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 3452 20-04-77, 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 3452 20-04-77, +7 905 823-37-90 (mobile).
E-mail: nikolenko-marina@mail.ru

Для цитирования:

Николенко М.В., Васева Е.М., Барышникова Н.В., Малишевская О.И.
Изучение каталазной активности микросимбионтов женского
репродуктивного тракта хронобиологическим методом // Инфекция
и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1187–1191. doi: 10.15789/2220-7619-
CAT-15453

Citation:

Nikolenko M.V., Vaseva E.M., Baryshnikova N.V., Malishevskaya O.I.
Chronobiological approach to study microsymbiont catalase activity
in female reproductive tract // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1187–1191.
doi: 10.15789/2220-7619-CAT-15453

*Исследование проведено в рамках гранта Тюменского ГМУ в области биомедицинских и биофармацевтических технологий № 8210053 от 12 августа 2021 г.
The study was supported by the grant of Tyumen State Medical University in biomedical and biopharmaceutical technologies No. 8210053 (August 12, 2021).*

CHRONOBIOLOGICAL APPROACH TO STUDY MICROSymbiont CATALASE ACTIVITY IN FEMALE REPRODUCTIVE TRACT

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

Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Abstract. Catalase is a heme-containing enzyme belonging to protection factors that destroys peroxide compounds. The presence of catalase activity is an important ability of microorganisms that allows them to be protected from unfavorable factors as well as adapt to macroorganism conditions. Catalase along with superoxide dismutase plays an important role in pathogen resistance to phagocyte oxygen-dependent bactericidal mechanisms. The aim of the study was to investigate microsymbiont catalase activity from female reproductive tract in normocenosis and candidiasis dysbiosis using the chronobiological approach. The study was conducted on clinical isolates, isolated from female reproductive tract microsymbiocenosis. The catalase activity was determined by spectrophotometry based on 24 hour-long hydrogen peroxide reduction with 3-hours interval in winter season. Dynamic hydrogen peroxide was assessed in 3–5 experiment replicates. In some *Lactobacillus* spp., catalase was found containing no heme group — pseudocatalase. Chronobiological approach allowed to reveal enzyme activity from all microsymbionts. The dominant and associative microbiota isolated from healthy females was characterized by circadian (24 hours) rhythms of catalase activity early in the morning — 5 a.m. ($p < 0.05$). Hydrogen peroxide decomposes spontaneously or via non-enzymatic catalysts, and microorganisms cope with this situation under such conditions. In microsymbionts characteristic of female reproductive tract dysbiosis, and usually found in large numbers along with decreased *Lactobacillus* spp. ultradian rhythms with 12- and 8-hour harmonics of catalase activity with acrophase were recorded in the morning (8 a.m.) and evening hours (8 p.m.). The minimum values of enzyme production in all cultures were recorded at 12 p.m. and 5 p.m. Therefore, the contribution of the rhythm of the studied parameter at varying degree of vaginal sterility reflects the adaptive pathogen capabilities to the conditions of existence and can be the basis for studying related regulatory mechanisms. Mesor and amplitude phase stability are universal rhythmometric parameters used to evaluate patient's condition independent of species assignment.

Key words: catalase activity, chronobiological approach, rhythmic parameters, normocenosis, dysbiosis, *Lactobacillus* spp.

Введение

Микробный биоценоз как совокупность бактериально-грибковых ассоциаций функционирует за счет различных биологических механизмов, обеспечивающих рост, размножение микросимбионтов, распределение их в экотопе и различные взаимодействия внутри популяции. Регулирование и формирование микробиоценоза в системе ассоциативного симбиоза основано на явлении антагонизма с одной стороны, продукция бактериями бактериоцинов, с другой — синтез лизоцима, органических кислот и перекиси водорода макроорганизмом [1].

В связи с этим возникает вопрос о влиянии биологически активных веществ доминантной, ассоциативной микробиоты на отдельные ферменты, обеспечивающие защиту микросимбионтов от стрессовых воздействий со стороны, как микробной ассоциации, так и макроорганизма. Одним из таких ферментов является каталаза, защищающая бактериальную клетку от действия перекиси водорода эндогенного и экзогенного происхождения [11].

Решение вопроса о способности микроорганизмов влиять на активность каталазы позволило бы расширить представления о роли различных видов автохтонных и аллохтонных микросимбионтов в формировании микробных биоценозов организма человека. На наш взгляд, хронобиологический подход к изучению данной проблемы открывает новые возможности в раскрытии механизмов межмикробных взаи-

модействий, а также позволяет разработать дополнительные критерии состояния здоровья пациента.

Цель — изучить каталазную активность микросимбионтов женского репродуктивного тракта при нормоценозе и кандидозном дисбиозе хронобиологическим методом.

Материалы и методы

Для выявления межмикробных взаимодействий микроорганизмов было изучено 10 микросимбиоценозов женского репродуктивного тракта (5 — нормоценозов и 5 — кандидозных дисбиозов), изолировано 45 культур микроорганизмов, представителей облигатно- и факультативно анаэробной микробиоты пациентов в возрасте от 19 до 35 лет (Решение Комитета по этике при ФГБОУ ВО Тюменского государственного медицинского университета № 102 от 22.10.2021 г.). Женщины имели регулярный менструальный цикл, в анамнезе отсутствовали гинекологические оперативные вмешательства, аборт, выкидыши, гормональная терапия, инфекционные заболевания, передаваемые половым путем (ВИЧ-инфекция, сифилис, гонорея, трихомониаз, хламидиоз). Видовая идентификация микросимбионтов проводилась методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) по протеиновым профилям.

Микробная ассоциация при нормобиозе биотопа включала *Lactobacillus crispatus* (*L. crispatus*

tus), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) и *Enterococcus faecium* (*E. faecium*). При дисбиозе преобладали *Lactobacillus iners* (*L. iners*), *Lactobacillus jensenii* (*L. jensenii*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) и *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Candida albicans* (*C. albicans*).

Активность каталазы определяли спектрофотометрическим методом по убыли пероксида водорода в течение суток с 3-часовым интервалом [3] в зимнее время года, IV фаза Луны. К 0,2 мл взвеси микроорганизмов добавляли 1 мл раствора перекиси водорода с концентрацией 0,0120 М, инкубировали 10 мин при комнатной температуре, затем прибавляли 0,2 мл раствора хлористоводородной кислоты с концентрацией 2 М и 1 мл раствора калия йодида с концентрацией 0,025 М, перемешивали, центрифугировали в режиме 3000 об/мин и 15 мин, после чего измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости не позднее 10 мин после центрифугирования при длине волны 492 нм. Контрольный опыт готовили по аналогичной процедуре, без добавления взвеси микроорганизмов. Раствор сравнения при спектрофотометрии — вода очищенная.

Данные были обработаны по методу наименьших квадратов (косинор-анализ) при заданной значимости достоверности $p < 0,05$ [9]. Для каждого штамма впоследствии определены основные параметры ритмов с периодами $T = 12$ и $T = 24$ часа: мезор (М) — среднее значение гармонической кривой наилучшей аппроксимации функции (косинусоиды), амплитуда ритма (А) — расстояние от экстремума до мезора и акрофаза (f) — момент времени ожидаемого экстремума функции.

Статистическую обработку материалов осуществляли с использованием программ: Primer of Biostatistics Version 4.03 by Stanton A. Glantz, 1998; Microsoft Office Excel 2010.

Результаты и обсуждение

Микробиота женского репродуктивного тракта — уникальная модель для изучения межмикробных взаимоотношений при ассоциативном симбиозе, так как это равновесная динамическая система организма человека и населяющей его доминантной и ассоциативной микрофлоры. Важнейшими представителями облигатной доминантной микробиоты влагалища являются *Lactobacillus* spp., поддерживающие нормальный микробиологический статус занимаемого биотопа.

По данным авторитетных исследований, у многих строгих и аэротолерантных анаэробов отсутствует продукция каталазы [2]. К их числу относят молочнокислые бактерии, у которых дисмутацию образующихся ионов кислорода обеспечивают ионы магния, находящиеся в клетках в высоких концентрациях [4].

В пилотных экспериментах традиционный тест на расщепление 3% перекиси водорода культурами *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *E. faecalis*, *E. faecium* показал отрицательный результат. Отсутствие каталазы у молочнокислых бактерий и энтерококков связано с тем, что они не могут синтезировать гем-простетическую группу фермента, но способны к синтезу апофермента [6]. У отдельных видов молочнокислых бактерий обнаружена каталаза, не содержащая гемовой группы — псевдокаталаза [8].

Высокочувствительный хронобиологический метод позволил выявить активность такого фермента у всех изучаемых культур микросимбионтов. Доминантная и ассоциативная микробиота, выделенная от здоровых женщин, характеризовалась циркадианными (околосуточными) ритмами каталазной активности с одним пиком в ранние утренние часы — 5:00. Вклад циркадианного ритма составил 79,3–84,5% ($p < 0,05$). Для всех культур *Lactobacillus* spp. и *Enterococcus* spp. характерен одинаковый профиль ритма. Мезор и амплитуда каталазной активности как стабильные ритмометрические параметры не зависели от вида микроорганизма в популяции. Чем больше амплитуда, тем труднее индуцировать сдвиг акрофазы [10]. Результаты представлены на рис. 1.

Следовательно, при доминировании в биотопе анаэробных прокариот *L. crispatus* 10^6 – 10^7 КОЕ/мл, *E. faecalis* и *E. faecium* 10^2 – 10^3 КОЕ/мл, способных переносить контакт с кислородом и его производными в относительно небольших масштабах, роль каталазы незначительная, с одним пиком активности в утренние часы. Перекись водорода разлагается спонтанно или с участием неферментативных катализаторов, и микроорганизмы справляются с ней в этих условиях. Таким образом, при осуществлении энергетического метаболизма анаэробного типа для устранения токсических эффектов кислорода достаточно одной ферментной преграды в виде супероксиддисмутазы [5].

У микросимбионтов, характерных для дисбиоза женского репродуктивного тракта и обычно обнаруживаемых в большом количестве на фоне снижения *Lactobacillus* spp. регистрировались ультрадианные ритмы с 12- и 8-часовыми гармониками каталазной активности с акрофазой в утренние и вечерние часы (8:00; 20:00). Минимальные значения продукции фермента у всех культур фиксировались в 12:00 и 17:00 часов (рис. 2).

Экспериментально доказано повышение среднесуточных показателей синтеза фермента в 6–8 раз у всех ассоциантов в микросимбиозе ($p < 0,05$) в опытной группе при дисбиотических изменениях изучаемого биотопа, по сравнению с контрольной группой. Таким

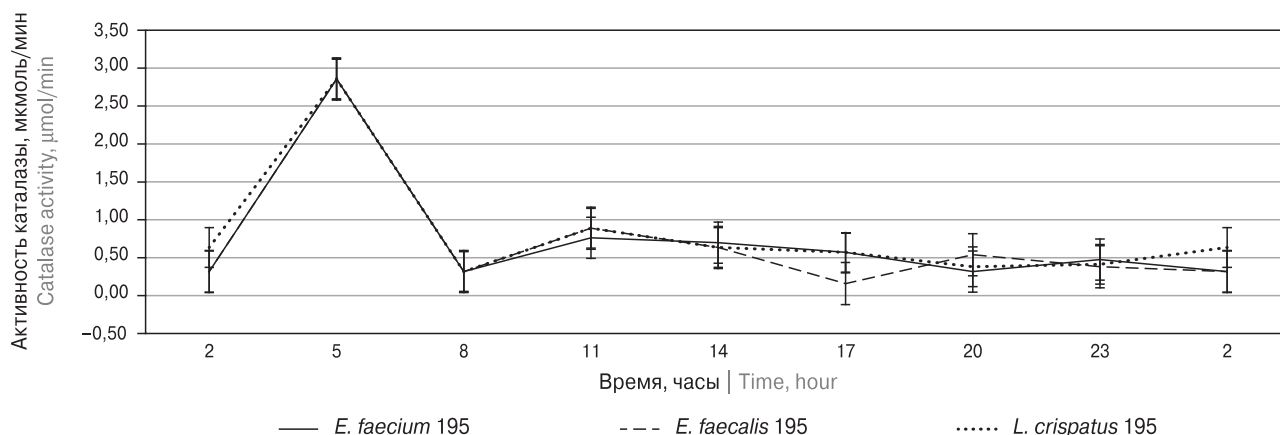


Рисунок 1. Суточная динамика активности каталазы микросимбионтов женского репродуктивного тракта у здоровых женщин

Figure 1. Diurnal dynamics of microsymbiont catalase activity in healthy female reproductive tract

Примечание. По оси абсцисс — время суток, часы; по оси ординат — активность каталазы, мкмоль/мин.

Note. X-axis — time of day, hours; Y-axis — catalase activity, µmol/min.

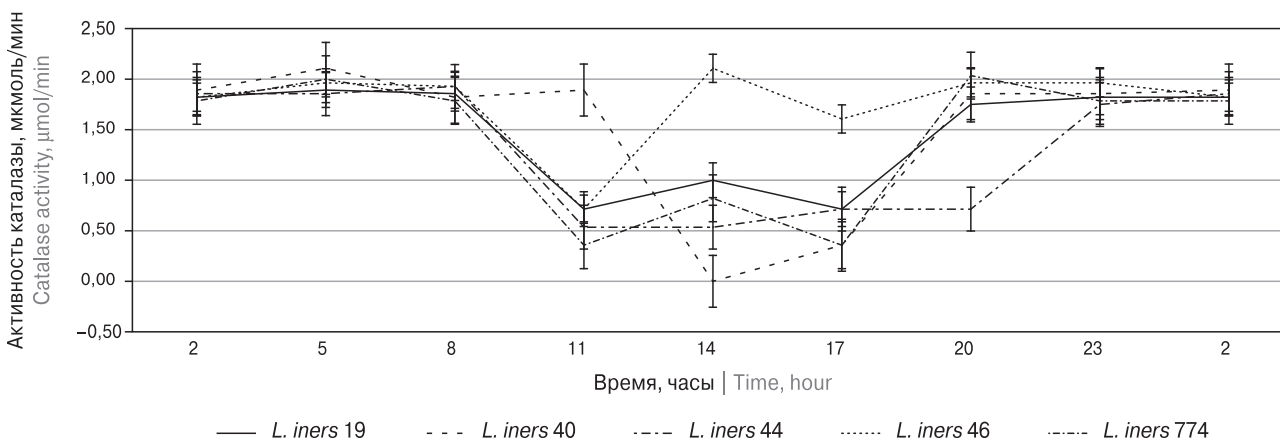


Рисунок 2. Суточная динамика активности каталазы микросимбионтов женского репродуктивного тракта у женщин с кандидозным дисбиозом

Figure 2. Diurnal dynamics of microsymbiont catalase activity in female reproductive tract during candidiasis dysbiosis

Примечание. По оси абсцисс — время суток, часы; по оси ординат — активность каталазы, мкмоль/мин.

Note. X-axis — time of day, hours; Y-axis — catalase activity, µmol/min.

образом, мезор и амплитудно-фазовая стабильность являются диагностическими критериями состояния биотопа пациента.

При увеличении в популяции факультативно-анаэробных прокариот *E. faecalis*, *E. faecium*, *K. pneumonia*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* в 10^5 – 10^6 КОЕ/мл и снижение числа *L. iners*, *L. jensenii* до 10^3 – 10^4 КОЕ/мл неферментативные пути устранения перекиси водорода становятся не эффективными. Для разложения субстрата, необходима каталаза, проявляющая активность с периодичностью в 8–12 часов. Таким образом, в условиях активного взаимодействия клеток с кислородом, делающего возможным аэробную жизнь, система ферментной защиты от его токсических эффектов сформирована с участи-

ем супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы в качестве необходимых компонентов.

Вероятно, в биотопе женщин с 3–4 степенью чистоты влагалища анаэробные бактериальные клетки координируют экспрессию фактора патогенности, обеспечивающую многообразные формы существования с помощью системы QS [7] за счет облигатно- и факультативно-аэробных прокариот [6].

Выводы

Хронобиологический метод позволил выявить активность фермента у всех микросимбионтов, выделенных из женского репродуктивного тракта.

Доказано, что вклад ритма изучаемого показателя при различной степени чистоты влаги отражает адаптационные возможности патогенов к условиям существования и может служить методическим ключом при изучении механизмов их регуляции.

Мезор и амплитудно-фазовая стабильность каталазной активности микросимбионтов являются универсальными ритмометрическими параметрами, оценивающими состояние па-

циента, и не зависят от видовой принадлежности культуры.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность Тюменскому ГМУ за предоставленное финансирование и директору ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора Т.Ф. Степановой за проведенную идентификацию культуры.

Список литературы/References

1. Андруков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф. Стратегии программированной клеточной гибели у прокариот // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 1. С. 15–26. [Andrukov B.G., Somova L.M., Timchenko N.F. Strategy of programmed cell death in prokaryotes. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 15–26. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2015-1-15-26
2. Брюханов А.Л., Нетрусов А.И. Аэротолерантность строго анаэробных микроорганизмов: факторы защиты от окислительного стресса (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43, № 6. С. 635–652. [Bryukhanov A.L., Netrusov A.I. Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms: factors of protection from oxidative stress (review). *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2007, vol. 43, no. 6, pp. 635–652. (In Russ.)]
3. Бухарин О.В., Черкасов С.В., Сгибнев А.В., Забирова Т.М., Иванов Ю.Б. Влияние микробных метаболитов на активность каталазы и рост *Staphylococcus aureus* 6538 P // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2000. Т. 130, № 7. С. 80–82. [Bukharin O.V., Cherkasov S.V., Sgibnev A.V., Zabirowa T.M., Ivanov Yu.B. Influence of microbial metabolites on catalase activity and growth of *Staphylococcus aureus* 6538 P. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology*, 2000, vol. 130, no. 7, pp. 80–82. (In Russ.)]
4. Курбанов А.И., Караев З.О. Роль каталазы и супероксиддисмутазы микроорганизмов при их фагоцитозе макрофагальными клетками // Биомедицина. 2005. № 3. С. 44–45. [Kurbanov A.I., Karaev Z.O. The role of catalase and superoxide dismutase of microorganisms during their phagocytosis by macrophage cells. *Biomeditsina = Biomedicine*, 2005, no. 3, pp. 44–45. (In Russ.)]
5. Романова Е.В. Ферменты в антиокислительной системе растений: супероксиддисмутазы // АГРО XXI. 2008. № 7–9. С. 28–29. [Romanova E.V. Enzymes in the antioxidant system of plants: superoxide dismutase. *AGRO XXI*, 2008, no. 7–9, pp. 28–29. (In Russ.)] URL: <https://www.agroxxi.ru/journal/20080709/20080709013.pdf>
6. Сахно О.Н., Трифонова Т.А. Экология микроорганизмов: учебное пособие: В 3 частях. Часть 2. Владимир: Издательство Владимирского государственного университета, 2009. 52 с. [Sakhno O.N., Trifonova T.A. Ecology of microorganisms: textbook. Part 2. *Vladimir: Publishing House of the Vladimir State University*, 2009. 52 p. (In Russ.)] URL: <https://dspace.vvl.vsu.ru/bitstream/123456789/1383/3/00950.pdf>
7. Шпаков А.О. Сигнальные молекулы бактерий непептидной природы QS-типа // Микробиология. 2009. Т. 78, № 2. С. 163–175. [Shpakov A.O. Signal molecules of bacteria of non-peptide nature of QS-type *Mikrobiologiya = Microbiology*, 2009, vol. 78, no. 2, pp. 163–175. (In Russ.)]
8. Bailly C., El-Maarouf-Bouteau H., Corbineau F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biol.*, 2008, vol. 331, no. 10, pp. 806–814. doi: 10.1016/j.crv.2008.07.022
9. Nelson W., Tong Y.L., Lee J.K., Halberg F. Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia*, 1979, vol. 6, no. 4, pp. 305–323.
10. Patent No. 5163426 United States, Int. Cl. A61M21/00; A61B10/00; A61M21/02; A61N5/06; (IPC1-7): A61N5/06. Assessment and modification of a subjects endogenous circadian cycle. No. 07/066677; application: 06.26.1987; date of publication 11.17.1992 / Czeisler C.A., Kronauer R.E., Allan J.S. Proprietors: Brigham, And Women's Hospital (Boston, MA). 75 p.
11. Zemser R.B., Martin S.E. Heat stability of virulence-associated enzymes from *Listeria monocytogenes* SLCC 5764. *J. Food Prot.*, 1998, vol. 61, no. 7, pp. 899–902. doi: 10.4315/0362-028x-61.7.899

Авторы:

Николенко М.В., д.б.н., профессор кафедры микробиологии, зав. лабораторией микробиома, регенеративной медицины и клеточных технологий 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;

Барышников Н.В., старший преподаватель 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.

Authors:

Nikolenko M.V., DSc (Biology), Professor of the Department of Microbiology, Head of Laboratory of Microbiome, Regenerative Medicine and Cellular Technologies, 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;

Baryshnikova N.V., Senior Lecturer, 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.

IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF VACCINATION IN HIV-INFECTED PATIENTS

A.V. Zhestkov, M.O. Zolotov, E.V. Kadantseva, T.R. Nikitina, A.D. Protasov

Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Abstract. Until recently, HIV infection does not lose its relevance. In 2022, 630 000 people died and 1.3 million people became infected with the human immunodeficiency virus (HIV). HIV-positive persons develop more infectious diseases than healthy people do; the causative agents are mainly opportunistic microorganisms. *Streptococcus pneumoniae* is the main causative agent of infection in the lungs in HIV-infected persons. In order to prevent the development of severe pneumococcal infections and to overcome antibiotic resistance, vaccines have been developed. There are polysaccharide (PPV) and conjugate (PCV) vaccines. According to clinical recommendations, vaccination of previously unvaccinated HIV-infected patients is carried out regardless of T-helper cell level. However, no data were found on the effect of PCV13 on immunological memory cells. The purpose of this study is to assess an effect of PCV13 vaccination on the immune system in HIV-infected subjects. **Materials and methods.** The study included 200 patients with HIV infection, which were divided into two groups: I — received a dose of PCV13 (n = 100) and control group (n = 100). During the first visit, immunological and microbiological studies were carried out. On the second visit, a PCV13 was injected into the deltoid muscle. The third visit was made a year later, where immunological and microbiological studies were repeated. Participants were divided into 4 subgroups depending on CD4⁺ T cell level. The microbial study was done using a swab collected from the back of the throat. **Results.** During the immunological examination at visit 1, abnormalities were detected in all examined populations and immune cell subsets. At 12 months post-vaccination, the median levels of CD3⁺CD4⁺ and CD45^{RO+} T lymphocytes in the immunized group were higher than pre-vaccination levels compared to control group, in which the values changed insignificantly. Our data confirm the immunological effectiveness of PCV13 administration in HIV-infected patients. In patients with peripheral blood CD19⁺ lymphocyte deficiency, had increased microbial detection rate (p = 0.003). **Conclusion.** As a result, due to the high risk of pneumococcal pneumonia, HIV-infected patients should be immunized with a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine.

Key words: HIV-infected, PCV13, *Streptococcus pneumoniae*, vaccination, pneumococcal pneumonia.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВАКЦИНАЦИИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Жестков А.В., Золотов М.О., Каданцева Е.В., Никитина Т.Р., Протасов А.Д.

ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Самара, Россия

Резюме. Проблема ВИЧ-инфекции не теряет своей актуальности до настоящего времени. В 2022 г. 630 000 человек умерли и 1,3 млн человек заразились вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). У ВИЧ-инфицированных, в отличие от здоровых лиц, чаще развиваются инфекционные заболевания, возбудителями которых являются в основном условно-патогенные микроорганизмы. Основным возбудителем пневмонии у ВИЧ-инфицированных является *Streptococcus pneumoniae*. Для предотвращения развития тяжелых форм

Адрес для переписки:

Каданцева Елизавета Викторовна
443079, Россия, г. Самара, ул. Гагарина, 18,
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.
Тел.: 8 987 437-45-19.
E-mail: lizandria1134@mail.ru

Contacts:

Elizaveta V. Kadantseva
443079, Russian Federation, Samara, Gagarina str., 18,
Samara State Medical University.
Phone: +7 987 437-45-19.
E-mail: lizandria1134@mail.ru

Для цитирования:

Жестков А.В., Золотов М.О., Каданцева Е.В., Никитина Т.Р., Протасов А.Д. Иммунологические аспекты вакцинации ВИЧ-инфицированных пациентов // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1192–1196. doi: 10.15789/2220-7619-IAO-9640

Citation:

Zhestkov A.V., Zolotov M.O., Kadantseva E.V., Nikitina T.R., Protasov A.D. Immunological aspects of vaccination in HIV-infected patients // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1192–1196. doi: 10.15789/2220-7619-IAO-9640

пневмококковой пневмонии и преодоления антибиотикорезистентности разработаны вакцины, содержащие антигены из капсулы *S. pneumoniae*. Созданы и активно применяются в клинической практике пневмококковые полисахаридные (ППВ) и пневмококковые конъюгированные вакцины (ПКВ). Однако не обнаружено данных о влиянии ПКВ13 на клетки иммунологической памяти. Целью данного исследования является изучение влияния вакцинации ПКВ13 на иммунную систему у ВИЧ-инфицированных лиц. *Материалы и методы.* В исследование были включены 200 больных ВИЧ-инфекцией, которые были разделены на две группы: I, получившая дозу ПКВ13 ($n = 100$), и контрольная ($n = 100$). Во время первого визита были проведены иммунологические и микробиологические исследования. Во второй визит осуществлялось введение в дельтовидную мышцу ПКВ13. Третий визит был выполнен через 1 год, повторно проводились иммунологическое и микробиологическое исследования. Участники были разделены на 4 подгруппы в зависимости от уровня $CD4^+$ клеток. Микробиологическое исследование проводилось в материале мазка с задней стенки глотки. *Результаты.* При проведении иммунологического обследования на визите 1 были выявлены отклонения во всех изученных популяциях и субпопуляциях клеток иммунной системы. Через 12 месяцев после вакцинации медиана уровня $CD3^+CD4^+$ и $CD45^{RO+}$ лимфоцитов в иммунизированной группе стала выше довакцинального уровня, в отличие от контрольной группы, в которой значения статистически не изменились. Наши данные подтверждают иммунологическую эффективность введения ПКВ13 у ВИЧ-инфицированных пациентов. У больных с дефицитом $CD19^+$ лимфоцитов в периферической крови выявлено увеличение частоты выделения микроорганизма ($p = 0,003$). *Заключение.* Таким образом, в связи с высоким риском развития пневмококковой пневмонии ВИЧ-инфицированные больные должны быть вакцинированы 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакциной.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, ПКВ13, *Streptococcus pneumoniae*, вакцинация, пневмококковая пневмония.

Introduction

In 2022, 630 000 people died and 1.3 million people became infected with the human immunodeficiency virus (HIV), and there are 39 million people living with HIV (PLHIV) in the world [14]. In the Russian Federation in 2022, 63 150 new cases of infection were detected, 34 410 people died, which is 0.9% more than in 2021 [6].

The causative agents of infectious diseases in PLHIV are opportunistic microorganisms [11]. In 25–60% of HIV-infected patients, lung damage of infectious origin (tuberculosis, pneumocystis and bacterial pneumonia) is observed [3]. The most common causative agents of community-acquired pneumonia are *S. pneumoniae* (up to 20%), *H. influenzae* (10–15%) and *S. aureus* (5–10%). Pneumonia caused by *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* also occurs, but is quite rare [1, 2, 4, 5, 7, 9].

To prevent the development of severe forms of pneumococcal infections and to overcome antibiotic resistance, vaccines have been created. Polysaccharide (PPV) and conjugated (PCV) pneumococcal vaccines have been developed. The 13-valent conjugate pneumococcal vaccine contains antigens from thirteen serotypes of pneumococcus, and the 23-valent polysaccharide vaccine contains from twenty-three serotypes [7]. PCV13 contains polysaccharide antigens conjugated to a carrier protein (diphtheria toxoid CRM197). This binding of molecules allows one to attract T-lymphocytes to the site of inflammation and increase the effectiveness of the immune response. PCV13 is approved for use in children from 6 months of age; it reduces the carriage of pneumococcus on the mucous membrane of the

upper respiratory tract and does not require repeated administration in adults.

According to clinical recommendations, vaccination of HIV-infected against pneumococcus, who have not been previously vaccinated, is carried out regardless of the level of T-helpers. Previously unvaccinated people are given PCV13, no earlier than 8 weeks later PPV23 is given, after 5 years PPV23 is revaccinated [8].

Several studies have been conducted to evaluate the effectiveness of PCV13 in HIV-infected adults. Research carried out at the University Hospital of Reims to determine the immunological efficacy of PCV13 in PLHIV. As a result was found that a single vaccination leads to a positive immunological response and protection 1 month after vaccination in a group of patients with an initial $CD4^+$ level of 200 cells/ μ l and a $CD4^+/CD8^+$ ratio more than 0.8. After 6 and 12 months, the percentage of protected patients decreases. In addition, after vaccination with PCV13, an increase in the opsonophagocytic reaction of anti-pneumococcal antibodies was noted [12].

A study from South Korea examined the effectiveness of PCV13 in PLHIV depending on baseline T-helper cell levels [13]. A lower immune response to the vaccine was found in individuals with a T-helper cell count of less than 350 cells/ μ L. In addition, lower levels of specific IgG were reported in this group.

A meta-analysis that included 28 cohort studies and 11 randomized clinical trials examined the effectiveness of different pneumococcal vaccination regimens [10]. The immunological effectiveness of PCV13 administration has been demonstrated. At the same time, multiple vaccination led to only a slight increase in IgG and was not economically effective.

Limitations of the different studies include the absence of information about the effect of PCV13 administration on immunological memory cells. In addition, the main attention was paid to the assessment of the T-cell component of immunity and the effect on B cells was not presented. However, it is B-lymphocytes produce antibodies, which are a key link in the fight against pneumococcus.

The purpose of the study is to evaluate the immunological efficacy of PCV13 vaccination in HIV-infected people.

Materials and methods

In the study were included 200 HIV-infected people, which were divided into two groups: I — received a dose of PCV13 ($n = 100$) and control ($n = 100$).

For the entire period of the study, for patients were planned 3 visits. At the first visit, the following studies were performed: microbiological examination of a smear from the posterior pharyngeal wall, immunological examination of peripheral blood (determination of $CD3^+CD4^+$, $CD19^+$, $CD45^{RO+}$ lymphocytes). The second visit was only for the immunized group, where PCV13 was injected into the deltoid muscle. The third visit was performed after 12 months, immunological and microbiological studies were repeated.

Determination of populations and subpopulations of lymphocytes was carried out by flow cytometry. Depending on the level of $CD4^+$ cells (T-helpers), the participants were divided into 4 subgroups: 1st — from 50 to 199 cells/ μ l of blood (immunized group $n = 19$, control group $n = 25$); 2nd — 200–349 cells/ μ l (immunized group $n = 20$, control group $n = 14$); 3rd — 350–499 cells/ μ l (immunized group $n = 17$,

control group $n = 21$); 4th — 500 or more cells/ μ l. (immunized group $n = 44$, control group $n = 40$).

To conduct a microbiological study, a smear was taken from the posterior pharyngeal wall. The biomaterial was seeded on the following media: media: 5% blood agar, chocolate agar, Sabouraud's medium, universal chromogenic media. The isolated strains were identified by matrix-activated laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-ToF) mass spectrometry.

Statistical data processing was carried out using the Statistica 13.0 program (STATSOFT, USA; license 2883). All the studied samples were distributed abnormally, so non-parametric statistics methods were applied to their study. The results were considered statistically significant if the significance level (p) was less than 0.05.

Results and discussion

At the first visit, the following median lymphocyte levels were obtained in vaccinated patients (Fig. 1). The median level of T-helpers in those examined in the 1st subgroup was 115 cells/ μ l, in the 2nd subgroup — 254.5 cells/ μ l, in the 3rd subgroup — 421 cells/ μ l, in the 4th subgroup — 663.5 cells/ μ l. At the 3rd visit, there was an increase in the 1st subgroup up to 205 cells/ μ l ($p = 0.001$), in the 2nd one — up to 377 cells/ μ l ($p = 0.001$), in the 3rd one — up to 478 cells/ μ l ($p = 0.004$) and in the 4th — up to 735 cells/ μ l ($p = 0.096$).

The dynamics of changes in the number of B-lymphocytes in all the studied subgroups had no statistical significance. At the same time, a statistically significant increase in the number of cells involved in the mechanisms of immunological memory ($CD45^{RO+}$ lymphocytes) was registered in vaccinated PLHIV. The value of the median level of $CD45^{RO+}$

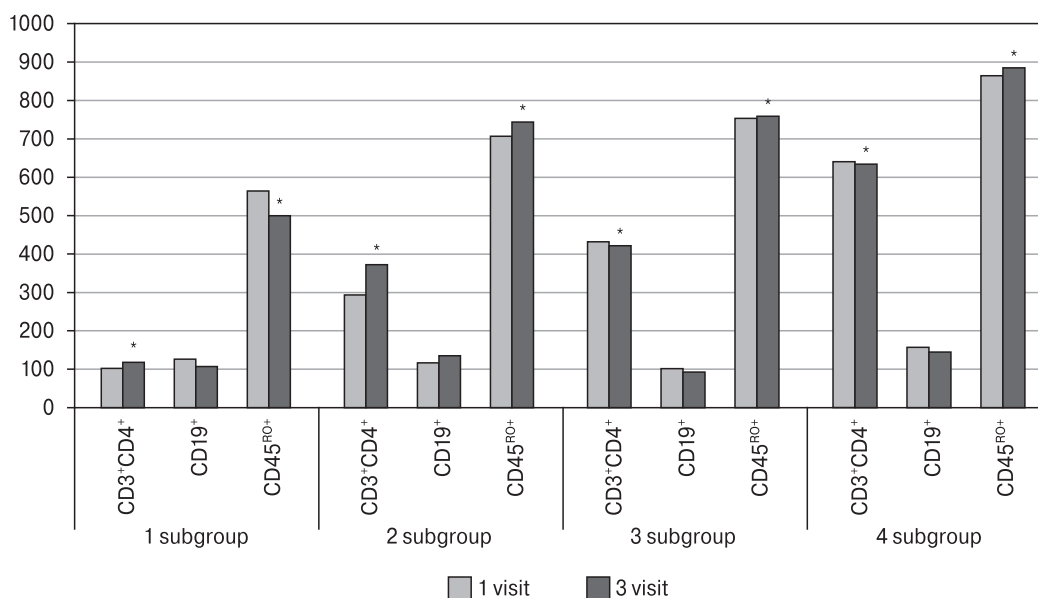


Figure 1. The value of the median parameters of the immunogram in patients of the immunized group at visits 1 and 3

Note. * $p < 0.05$.

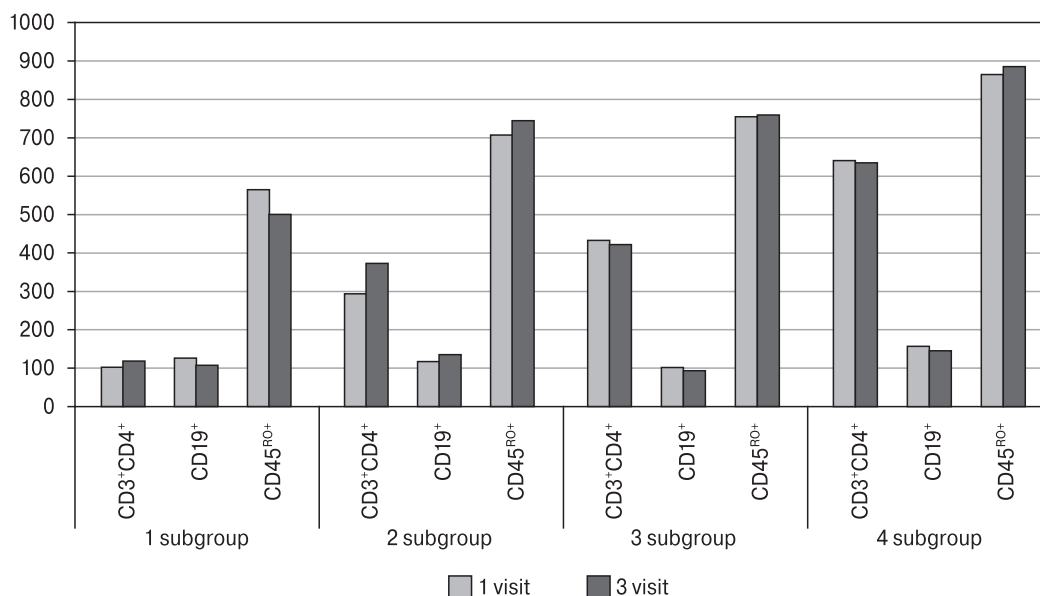


Figure 2. The value of the median of immunogram parameters in patients of the control group at visits 1 and 3

lymphocytes in the first subgroup increased from 556 cells/ μl at visit 1 to 623 cells/ μl at visit 3 ($p = 0.030$); in the second subgroup from 778.5 cells/ μl to 818 cells/ μl ($p = 0.028$); in the third subgroup from 701 cells/ μl to 749 cells/ μl ($p = 0.022$); in the fourth subgroup, from 848 cells/ μl at the 1st visit to 924 cells/ μl at the 3rd visit ($p = 0.01$).

Participants in the control group showed no statistically significant changes in the median levels of CD3⁺CD4⁺, CD19⁺, CD45^{RO+} lymphocytes in all four subgroups (Fig. 2). The dynamics of changes in the content of T-helpers in peripheral blood was: in the examined in the 1st subgroup — from 102 cells/ μl to 118 cells/ μl ($p = 0.322$), in the 2nd — from 293.5 cells/ μl to 372.5 cells/ μl ($p = 0.164$), in the 3rd subgroup — from 432 cells/ μl to 421.5 ($p = 0.446$), in the 4th subgroup from 640 cells/ μl to 634 cells/ μl ($p = 0.326$).

A similar trend was found when assessing the median of B cells: in the first subgroup from 126 cells/ μl to 107 cells/ μl ($p = 0.717$), in the second subgroup — from 117 cells/ μl to 135 cells/ μl ($p = 0.808$). In addition, there were no statistically significant differences in the change in the level of median immunological memory cells. In the 1st subgroup, their value decreased from 564 to 499.5 cells/ μl ($p = 0.478$), in the 2nd, 3rd and 4th subgroups it increased from 706.5 to 743.5 cells/ μl ($p = 0.520$), from 640 to 758.5 cells/ μl ($p = 0.542$), from 864 to 884.5 cells/ μl ($p = 0.412$), respectively.

References

1. Дворак С.И., Гусев Д.А., Суборова Т.Н., Захарова Н.Г., Сизова Н.В., Буланьков Ю.И. Оптимизация стартовой эмпирической антибактериальной терапии у больных ВИЧ-инфекцией — пациентов специализированного стационара // Журнал инфектологии. 2019. Т. 11, № 2. С. 97–106. [Dvorak S.I., Gusev D.A., Suborova T.N., Zakharova N.G., Sizova N.V., Bulan'kov Yu.I. Optimization of starting empirical antibacterial therapy in patients with HIV infection — specialized hospital patients. *Zhurnal infekologii = Journal Infectology*, 2019, vol. 11, no. 2, pp. 97–106. (In Russ.) doi: 10.22625/2072-6732-2019-11-2-97-106]
2. Зими́на В.Н., Астафьев А.В. Внебольничные пневмонии у взрослых больных ВИЧ-инфекцией: особенности течения и лечения, профилактика // Пульмонология. 2016. Т. 26, № 4. С. 488–497. [Zimina V.N., Astaf'ev A.V. Community-

When conducting a statistical analysis, a correlation was found between the level of B-cells in the peripheral blood and the detection of pneumococcus on the mucous membrane of the upper respiratory tract. In those examined with a deficiency of CD19⁺ lymphocytes in the peripheral blood, an increase in the frequency of isolation of the microorganism was found ($p = 0.003$).

Thus, the obtained data correlate with literary sources and confirm the immunological effectiveness of PCV13 administration [10, 12, 13]. A pronounced stimulation of the cellular link of the immune system was revealed, which was expressed in a statistically significant increase in the level of T-helpers in those examined with a CD3⁺CD4⁺ deficiency at the time of the start of the study. It is important to note that immunization led to an increase in the number of immunological memory cells, which demonstrates the effectiveness of the vaccination. At the same time no statistically significant differences were found in the control group.

Conclusion

Thus, the introduction of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine to HIV-infected patients causes immunological effects and can effectively reduce the risk of infections caused by *S. pneumoniae*.

- acquired pneumonia in adult HIV-infected patients: course, treatment, and prevention. *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2016, vol. 26, no. 4, pp. 488–497. (In Russ.) doi: 10.18093/0869-0189-2016-26-4-488-497
3. Мишин В.Ю., Протасов А.Д., Жестков А.В. Заболевания легких у пациентов с ВИЧ-инфекцией. В кн.: Респираторная медицина: руководство: в 3 т. Т. 3. М.: Литтерра, 2017. С. 251–263. [Mishin V.Yu., Protasov A.D., Zhestkov A.V. Lung diseases in patients with HIV infection. In: Respiratory medicine. Manual. Vol. 3. Moscow: Litterra, 2017, pp. 251–263.]
 4. Николенко В.В. Пневмококковая инфекция у ВИЧ-инфицированных пациентов // Пермский медицинский журнал. 2012. Т. 29, № 1. С. 5–9. [Nikolenko V.V. Pneumococcal infection in HIV-infected patients. *Permskii meditsinskii zhurnal = Perm Medical Journal*, 2012, vol. 29, no. 1, pp. 5–9. (In Russ.)]
 5. Пузырева Л.В., Сафонов А.Д., Мордык А.В. Заболевания органов дыхания при ВИЧ-инфекции (обзор) // Журнал инфектологии. 2016. Т. 8, № 2. С. 17–25. [Puzyrjova L.V., Safonov A.D., Mordyk A.V. Diseases of respiratory organs at HIV infection (review). *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2016, vol. 8, no. 2, pp. 17–25. (In Russ.)]
 6. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Справка ВИЧ в России на 31.12.2021 г. [Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-being. Information on HIV in Russia as of 31.12.2021. (In Russ.)] URL: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2022/03/Spravka-VICH-v-Rossii-na-31.12.2021-g.pdf>
 7. Харит С.М., Перова А.Л. Современные подходы к профилактике пневмококковой инфекции. Медицинский Совет. 2015. № 16. С. 64–67. [Kharit S.M., Perova A.L. Modern approaches to the prevention of pneumococcal infection. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2015, no. 16, pp. 64–67. (In Russ.)] doi: 10.21518/2079-701X-2015-16-64-67
 8. Чучалин А.Г., Брико Н.И., Авдеев С.Н., Белевский А.С., Биличенко Т.Н., Демко И.В., Драпкина О.М., Жестков А.В., Зайцев А.А., Игнатова Г.Л., Ковалишена О.В., Коршунов В.А., Костинов М.П., Мишланов В.Ю., Сидоренко С.В., Трушненко Н.В., Шубин И.В., Фельдблюм И.В. Федеральные клинические рекомендации по вакцинопрофилактике пневмококковой инфекции у взрослых // Пульмонология. 2019. Т. 29, № 1. С. 19–34. [Chuchalin A.G., Briko N.I., Avdeev S.N., Belevskiy A.S., Bilichenko T.N., Demko I.V., Drapkina O.M., Zhestkov A.V., Zaytsev A.V., Ignatova G.L., Kovalishena O.V., Korshuchnov V.A., Kostinov M.P., Mishlanov V.Yu., Sidorenko S.V., Trushenko N.V., Shubin I.V., Feldblyum I.V. Federal Clinical Guidelines on Preventive Vaccination Against Pneumococcal infections in Adults. *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2019, vol. 29, no. 1, pp. 19–34. (In Russ.)] doi: 10.18093/0869-0189-2019-29-1-19-34
 9. Cillóniz C., García-Vidal C., Moreno A., Miro J.M., Torres A. Community-acquired bacterial pneumonia in adult HIV-infected patients. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2018, vol. 16, no. 7, pp. 579–588. doi: 10.1080/14787210.2018.1495560
 10. Garrido H.M.G., Schnyder J.L., Tanck M.W.T., Vollaard A., Spijker R., Grobusch M.P., Goorhuis A. Immunogenicity of pneumococcal vaccination in HIV infected individuals: a systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*, 2020, vol. 29–30: 100576. doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100576
 11. Lucar O., Reeves R.K., Jost S. A natural impact: NK cells at the intersection of cancer and HIV disease. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 10: 1850. doi: 10.3389/fimmu.2019.01850
 12. Romaru J., Bahuaud M., Lejeune G., Hentzien M., Berger J.L., Robbins A., Lebrun D., N'Guyen Y., Bani-Sadr F., Batteux F., Servettaz A. Single-dose 13-valent conjugate Pneumococcal vaccine in people living with HIV — immunological response and protection. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 791147. doi: 10.3389/fimmu.2021.791147
 13. Song J.Y., Cheong H.J., Noh J.Y., Choi M.J., Yoon J.G., Kim W.J. Immunogenicity and safety of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in HIV-infected adults in the era of highly active antiretroviral therapy: analysis stratified by CD4 T-cell count. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2020, vol. 16, no. 1, pp. 169–175. doi: 10.1080/21645515.2019.1643677
 14. UNAIDS. Aids by the numbers. URL: <https://www.unaids.org/en>

Авторы:

Жестков А.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Золотов М.О., к.м.н., ассистент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Каданцева Е.В., студент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Никитина Т.Р., к.м.н., доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Протасов А.Д., д.м.н., профессор кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия.

Authors:

Zhestkov A.V., DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Zolotov M.O., PhD (Medicine), Assistant, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Kadantseva E.V., Student, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Nikitina T.R., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Protasov A.D., DSc (Medicine), Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.05.2023
 Отправлена на доработку 02.11.2023
 Принята к печати 03.12.2023

Received 04.05.2023
 Revision received 02.11.2023
 Accepted 03.12.2023

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://iimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

Основные виды статей, публикуемых в журнале

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, кДа и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их включения в текст статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка в отдельный файл. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
 - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
 - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
 - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
 - полное название статьи, направляемой в редакцию;
 - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
 - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
 - дата отправления работы.
 - 2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»).

- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
 - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
- 6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
- 7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
- 8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий, редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы 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

Алябьева Н.М.	1117	Павленко А.В.	1027	Farhoudi B.	1161
Архипова А.Л.	1027	Поляева О.А.	1009	Ghasemzadeh A.	1169
Баженова Е.А.	1018	Попова Л.Л.	1141	Haghani S.	1161
Барышников Н.В.	1187	Рейнгардт Д.Э.	1129	Hanifzadeh Z.	1161
Басина В.В.	1129	Руденко Л.Г.	1018	Ivanov V.A.	1089
Бебякова Н.А.	1027	Садева З.З.	1117	Jahanfar S.	1169
Билалов Ф.С.	1079	Самодова О.В.	1027	Javaherian M.	1169
Бородина Л.Я.	1079	Самойликов Р.В.	1027	Kadantseva E.V.	1192
Булатов Ш.Э.	1079	Самойлов К.В.	1058	Kaftyreva L.A.	1109
Вакарина А.А.	1049, 1069	Свиич О.А.	1027	Karimi A.	1169
Васева Е.М.	1187	Семенова А.В.	1058	Kasymov O.T.	1089
Вершинина М.Г.	1117	Серикова Е.Н.	1129	Makarova M.A.	1109
Воронкова О.В.	1058	Степанова Е.А.	1018	Massumi-Naini H.	1161
Горская О.А.	1129	Степанова К.Б.	1049, 1069	Matveeva Z.N.	1109
Давыденко В.С.	1129	Степанова Т.Ф.	1049, 1069	Mehraeen E.	1169
Егорова А.Е.	1009	Терентьева Д.Р.	1079	Mesgarian M.	1161
Елькина М.А.	1009	Тотolian A.A.	1129	Milichkina A.M.	1089
Есимова И.Е.	1058	Фисенко А.П.	1117	Nikitina T.R.	1192
Есин Ю.И.	1027	Хасанова Р.Р.	1058	Nuridinova Z.N.	1089
Закирова А.М.	1079	Шеленков А.А.	1009	Nurmatov Z.S.	1089
Зуева Е.Б.	1129	Ширшова Н.Ю.	1129	Ostankova Yu.V.	1040
Иванова Л.В.	1027	Шемелев А.Н.	1129	Paranjkhoo P.	1169
Ильина Е.Н.	1027	Юнусбаев Б.Б.	1079	Parikhani S.N.	1169
Ильинских Е.Н.	1058	Юнусбаева М.М.	1079	Parmoon Z.	1169
Карасева О.В.	1117	Ямпольская А.В.	1058	Pashaei A.	1169
Карпухина Н.Ф.	1049	Ямпольская О.В.	1058	Pezeshgi P.	1169
Катаева Л.В.	1049, 1069	Янюшкина О.Г.	1117	Popova A.Yu.	1089
Киселева И.В.	1018	Яцышина С.Б.	1009	Protasov A.D.	1192
Ковальчук С.Н.	1027	Abolghasemi S.	1161	Ramsay E.S.	1089
Колотова О.Н.	1049, 1069	Afsahi A.M.	1169	Razumovskaya A.P.	1089
Константинов Д.Ю.	1141	Afzaljan A.	1169	Sattarova G.Z.	1089
Кригер Е.А.	1027	Ahmadi S.	1169	SeyedAlinaghi S.	1161, 1169
Кудрявцев А.В.	1027	Araby U.U.	1089	Shahidi R.	1169
Кусевичкая М.Б.	1129	Arjmand G.	1169	Shamsabadi A.	1169
Лазарева А.В.	1117	Atashi H.A.	1161	Smirnov V.S.	1089
Ларионова Н.В.	1018	Vaimova R.R.	1040	Smolenski V.Yu.	1089
Малеев В.В.	1009	Balde R.	1109	Stoyanova N.A.	1040
Малишевская О.И.	1187	Blinova O.V.	1040	Tamheri Zadeh S.S.	1169
Мамошина М.В.	1009	Boiro M.	1109	Tarjoman T.	1161
Машков И.А.	1129	Chouhdari A.	1161	Tokarevich N.K.	1040
Меремьянина Е.А.	1027	Dabanovic V.	1150	Totolian A.A.	1089
Михайлова Ю.В.	1009	Dashit M.	1169	Valizadeh M.	1161
Мотлохова Е.А.	1058	Dezfulinejad M.	1161	Varshochi S.	1169
Муккель Д.А.	1129	Drobyshevskaya V.G.	1089	Zangeneh M.	1161
Николенко М.В.	1187	Drozdz I.V.	1089	Zhestkov A.V.	1192
Новикова А.Ф.	1141	Dzhangaziev B.I.	1089	Zhimbaeva O.B.	1089
Новикова И.Е.	1117	Ebrahimi H.	1169	Zolotov M.O.	1192
Останкова Ю.В.	1129	Egorova S.A.	1089	Zueva E.V.	1089

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

антагонистическая активность	1049	молниеносное течение	1009	cultivating	1040
антибиотики	1079	мононуклеарные лейкоциты	1058	diarrhea	1109
антибиотикорезистентность	1027	неблагоприятный исход	1009	diarrheagenic <i>E. coli</i>	1109
ассоциации патогенов	1069	нозокомальные инфекции	1117	epidemiology	1169
аттенуация (att)	1018	нормоценоз	1187	<i>Escherichia coli</i>	1049
бактериemia	1117	пневмония	1069	Gam-COVID-Vac	1150
безопасность крови	1129	полиморфные варианты	1027	genetic determinants	1109
вариабельность ВГВ	1129	протеинограммы	1049	HBsAg	1141
вирулентность	1117	противовирусная терапия	1141	herd immunity	1089
вирус гепатита В	1129	резистентность	1069, 1117	HIV-infected	1192
вирус гриппа	1018	рекомбинантный интерлейкин-2	1141	hybrid immunity	1089
генетические маркеры	1027	ритмометрические параметры	1187	hydroxychloroquine	1161
генно-инженерная сборка		сепсис	1117	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1049, 1069, 1117
реассортантов (RGR)	1018	серологические маркеры	1129	Kyrgyz Republic	1089
генотипы	1129	сиквенс-типы	1049	<i>Lactobacillus</i> spp.	1187
детские инфекции	1009	скрытый гепатит В	1129	leptospira	1040
дисбиоз	1079, 1187	температурочувствительность		leptospirosis	1040
живая гриппозная вакцина (ЖГВ)	1018	(ts-признак)	1018	manifestations	1169
искодовый клещевой боррелиоз	1058	тенофовир	1141	monkeypox	1169
инвазивная стрептококковая		типирование <i>S. pyogenes</i>	1009	monkeypox infections	1169
инфекция группы А	1009	туберкулез	1079	monkeypox virus	1169
интерфероновые рецепторы	1027	тяжесть COVID-19	1027	nucleocapsid	1089
каталазная активность	1187	холодоадаптированность		outcome	1161
кишечные бактерии	1079	(са-признак)	1018	pathogenesis	1169
классическая реассортация (NR)	1018	хронический гепатит В	1141	pathogenicity	1109
клинически значимые мутации	1129	хронобиологический метод	1187	PCV13	1192
клиническое течение	1058	цитокины	1058	pneumococcal pneumonia	1192
коинфекция	1069	эпидемиология	1009	population	1089
комплексы генов вирулентности	1049	эритемная форма	1058	pre-exposure prophylaxis	1161
культура клеток крови	1058	16S rRNA	1040	receptor binding domain	1089
лабораторная диагностика	1009, 1129	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1069	safety	1150
липополисахарид	1058	adverse effects	1150	SARS-CoV-2	1069, 1089, 1161
маркеры резистентности	1049	adverse reactions	1161	seromonitoring	1089
метаболизм	1079	antibodies	1089	severe COVID-19	1161
микробиом кишечника	1079	CD4 ⁺ -лимфоциты	1141	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1192
молекулярно-биологические		collection	1040	susceptibility to antibiotics	1109
маркеры	1129	comorbidities	1150	vaccination	1089, 1150, 1192
молекулярное серотипирование	1049	COVID-19	1027, 1089, 1150	zoonotic disease	1040

Иллюстрации к статье «Влияние длительной антибиотикотерапии на состав и метаболический профиль кишечного микробиома при туберкулезе легких» (авторы: М.М. Юнусбаева, Д.Р. Терентьева, Л.Я. Бородина, А.М. Закирова, Ш.Э. Булатов, Ф.С. Билалов, Б.Б. Юнусбаев) (с. 1079–1090)

Illustrations for the article “Influence of long-term antibiotic therapy on gut microbiome composition and metabolic profile in pulmonary tuberculosis” (authors: Yunusbaeva M.M., Terentyeva D.R., Borodina L.Ya., Zakirova A.M., Bulatov S.E., Bilalov F.S., Yunusbayev B.B.) (pp. 1079–1090)

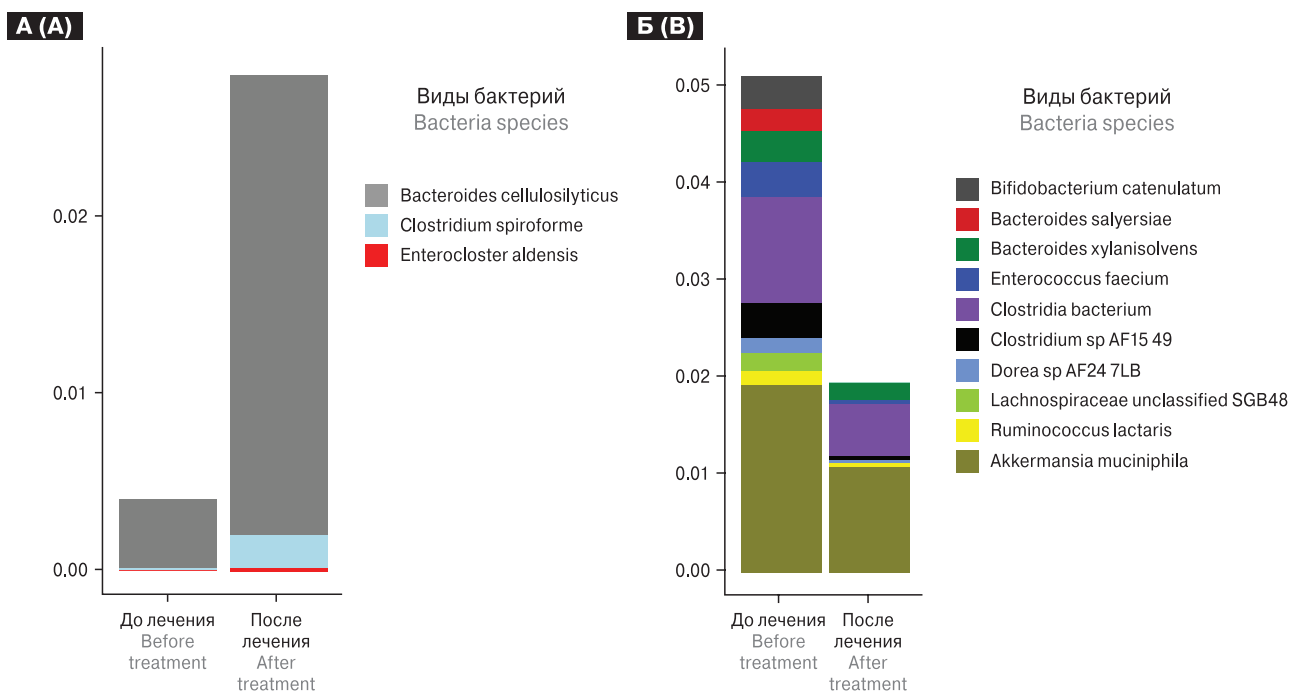


Рисунок 3. Частота дифференциально представленных таксонов, выявленных у больных ТБ до и после лечения

Figure 3. Percentage of differentially abundant taxa identified between pre-treatment and post-treatment TB pairs

Подписной индекс:
Урал-Пресс – 41392

