

2024

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

Иллюстрация к статье «Стратегии выживания, распространения и вирулентности возбудителя туляремии» (авторы: Т.Ю. Кудрявцева, А.Н. Мокриевич) (с. 9–23)

Illustration for the article “Strategies for tularemia pathogen survival, spread and virulence” (authors: Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N.) (pp. 9–23)

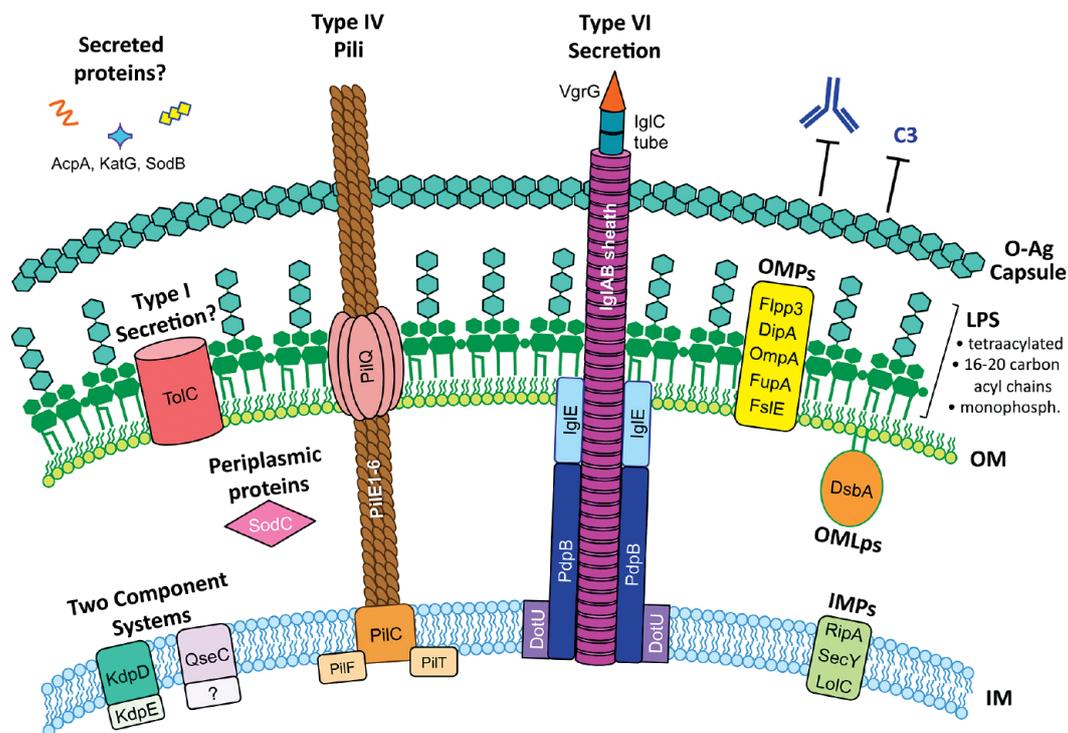


Рисунок 2. Особенности строения оболочки патогенных для человека подвидов *F. tularensis* и ее роль в вирулентности [104]

Figure 2. Features of shell structure in *F. tularensis* subspecies pathogenic to humans and its role in virulence [104]

Примечание. Капсула *F. tularensis*, идентичная О-антигену ЛПС, блокирует связывание антител и компонента С3 комплемента. ЛПС *F. tularensis* отличается тем, что он тетраацелирован, имеет длинноцепочечные ацильные цепи (длиной 16–20 атомов углерода), либо не фосфорилирован, либо монофосфорилирован, а также является слабым агонистом TLR4. Пили типа IV образуют роговидные выступы на поверхности бактерий, и хотя они коррелируют с вирулентностью, точная функция пилей типа IV *F. tularensis* неизвестна. Система секреции типа VI, кодируемая Francisella Pathogenicity Island (FPI), включает два повтора от 16 до 19 генов, ответственных за синтез соответствующего числа секретируемых белков «острова патогенности». *F. tularensis* секретирует также различные белки, включая AcpA, KatG и SodB, но механизмы их секреции неизвестны. Наружная мембрана (OM) *F. tularensis* содержит много наружных мембранных белков (OMP) и липопротеинов наружной мембраны (OMLps), которые необходимы для вирулентности. Периплазматические белки и белки внутренней мембраны (IMPs) также играют роль в вирулентности *F. tularensis*, но о них известно гораздо меньше.

Note. The *F. tularensis* capsule, identical to the LPS O-antigen, blocks the binding of antibodies and complement component C3. *F. tularensis* LPS is distinctive in that it is tetraacylated, has long-chain acyl chains (16–20 carbons in length), being either unphosphorylated or monophosphorylated, and is a weak TLR4 agonist. Type IV pili form horn-like projections on the surface of bacteria and, although they correlate with virulence, the precise function for type IV pili in *F. tularensis* is unknown. The type VI secretion system, encoded by the Francisella Pathogenicity Island (FPI), includes two repeats of 16 to 19 genes responsible for production of relevant number of secreted pathogenicity island proteins. *F. tularensis* also secretes various proteins, including AcpA, KatG, and SodB, but the underlying mechanisms are unknown. The outer membrane (OM) of *F. tularensis* contains many outer membrane proteins (OMPs) and outer membrane lipoproteins (OMLps) that are essential for virulence. Periplasmic proteins and inner membrane proteins (IMPs) also play a role in the virulence of *F. tularensis*, but much less is known about them.

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

январь–февраль

2024, том 14

№ 1

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

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

- Апт А.С.** д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики Центрального НИИ туберкулеза, Москва, Россия
Барбеито Л. д.м.н., профессор, 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
Лоуизир 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
Фрейдли 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
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,
наб. Обводного канала, 88, литера С,
помещ. 7-Н, оф. 1, 2.
Тел./факс: (812) 388-90-00.

Подписано в печать 26.02.2024 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1051

© Инфекция и иммунитет
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2024
© НИИЭМ имени Пастера, 2024
© СПб РО РААКИ, 2024

Russian Journal of Infection and Immunity (Infektsiya i immunitet)

January–February

2024, volume 14

No. 1

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

Editor-in-chief

Areg A. Totolian 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
- Irina S. Freidlin** DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Institute of Experimental Medicine, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
- Valery A. Chereshev** 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
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.
Тел.: (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,
Naberezhnaya Obvodnogo Kanala, 88,
build. C, suite 7-H, off. 1, 2.
Phone/fax: (812) 388-90-00.

Passed for printing 26.02.2024. 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, 2024

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2024

© SPb RAACI, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Кудрявцева Т.Ю., Мокриевич А.Н.

СТРАТЕГИИ ВЫЖИВАНИЯ, РАСПРОСТРАНЕНИЯ И ВИРУЛЕНТНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ	9
---	---

Оригинальные статьи

Чепур С.В., Парамонова Н.М., Мясникова И.А., Плужников Н.Н., Тюнин М.А., Каневский Б.А., Ильинский Н.С.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ТРАНСПОРТА ВИРУСНОГО МАТЕРИАЛА SARS-CoV-2 В НЕЙРОНАХ НЕОКОРТЕКСА СИРИЙСКИХ ХОМЯКОВ	24
---	----

Афридонова З.Э., Топтыгина А.П., Семикина Е.Л.

СОХРАНЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ К АНТИГЕНАМ SARS-CoV-2. ТРИ ГОДА НАБЛЮДЕНИЯ	35
---	----

Конюхов А.В., Костинова А.М., Локтионова М.Н., Костинов М.П., Печеник А.С.

РАЗЛИЧИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБЩЕГО АНАЛИЗА КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ COVID-19 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАТУСА ВАКЦИНАЦИИ	46
---	----

Юшкова С.В., Костинов М.П., Гладкова Л.С., Камелева А.А., Качнова А.С., Костинова А.М., Соловьева И.Л., Андреева Н.П., Дагиль Ю.А., Настаева Н.Ю., Крюкова Н.О., Локтионова М.Н.

УРОВЕНЬ АНТИТЕЛ К ШТАММАМ ВИРУСА ГРИППА У ЗДОРОВЫХ ВАКЦИНИРОВАННЫХ НА ЭТАПЕ ЗАВЕРШЕНИЯ ПАНДЕМИИ COVID-19	57
---	----

Долгова А.С., Капитонова М.А., Шабалина А.В., Саитова А.Т., Полев Д.Е., Макарова М.А., Кафтырева Л.А., Дедков В.Г.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНК SALMONELLA ENTERICA SEROVAR TURNI МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ С ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ	66
--	----

Дьякова М.Е., Серебряная Н.Б., Эсмедляева Д.С., Яблонский П.К.

СВЯЗЬ ИСХОДОВ ИНТЕНСИВНОЙ ФАЗЫ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫМ ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ С АКТИВНОСТЬЮ ФЕРМЕНТОВ ПУРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА И ЧИСЛЕННОСТЬЮ ПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ CD3⁺CD8⁺	77
--	----

Рейнгардт Д.Э., Останкова Ю.В., Ануфриева Е.В., Семенов А.В., Лялина Л.В., Тотолян А.А.

МУТАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ	86
--	----

Хасаннежад М., Абдолсалехи М.Р., Маншади С.А.Д., Асади С.М., Шахмохамади Э., Аббаспур Ф., Джахани Ш., СейедАлиаги С.

ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕЙ, ЖИВУЩИХ С ВИЧ В ИРАНЕ, ПО ДАННЫМ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ КЛИНИКИ: ПОПЕРЕЧНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	95
---	----

Кузнецова М.В., Сергеев В.И., Михайловская В.С., Кудрявцева Л.Г., Пегушина О.Г.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ KLEBSIELLA PNEUMONIAE, ВЫДЕЛЕННЫХ В УСЛОВИЯХ КАРДИОХИРУРГИЧЕСКОГО СТАЦИОНАРА	103
---	-----

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

ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ОПИСТОРХОЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НАРУШЕНИЯМИ УГЛЕВОДНОГО И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА	115
---	-----

Мейдани М., Хатами М., Абдоллахи А., Мирзапур П., Каримян Э., СейедАлиаги С.

БЕЗОПАСНОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОДНОДОЗОВОЙ И ДВУДОЗОВОЙ ВАКЦИНЫ ОТ СЕЗОННОГО ГРИППА У РЕЦИПИЕНТОВ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ: РАНДОМИЗИРОВАННОЕ КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	125
---	-----

Тханг Ч.Т., Канх Х.Д., Ту Н.Т.Н., Тханг Т.Д., Лан Л.Т.П., Лой К.Б., Ань Л.Ч.

ВИДОВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИМИКРОБНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭТИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ У ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ НОВОРОЖДЕННЫХ ПО ДАННЫМ НАЦИОНАЛЬНОЙ ДЕТСКОЙ БОЛЬНИЦЫ (ХАНОЙ, ВЬЕТНАМ) ЗА ПЕРИОД 2019–2021 гг.	133
---	-----

Альдоссари Х.М., Абдул Салам А.

ГЕОГРАФИЧЕСКОЕ РАСПРОСТРАНЕНИЕ ИНФЕКЦИИ COVID-19 В САУДОВСКОЙ АРАВИИ 141

Сутрияван А., Курниати Н., Новианти, Фариди У., Юсанти Л., Дестриани Ш.Н., Сапутра М.Х.Ф.

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ТЕМПЕРАТУРОЙ, ВЛАЖНОСТЬЮ, КОЛИЧЕСТВОМ ОСАДКОВ И СКОРОСТЬЮ ВЕТРА И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬЮ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ В МУНИЦИПАЛИТЕТЕ БАНДУНГА 155

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

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОГРАММ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИЙ И ИНФЕКЦИОННОГО КОНТРОЛЯ В ПСИХОНЕВРОЛОГИЧЕСКИХ СТАЦИОНАРАХ АРМЕНИИ 163

Краткие сообщения

Сиволодский Е.П., Краева Л.А., Мельникова Е.В., Горелова Г.В.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ACINETOBACTER BAUMANNII bv. TRYPTORHANDESTRUENS И ACINETOBACTER BAUMANNII 170

Прокопьев В.В., Куклина Н.В., Мазко О.Н., Макарова О.Г.

ИНДУКЦИЯ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА ДРОЖЖЕВЫМ КОМПОНЕНТОМ МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА КАК ФАКТОР ПАТОГЕННОСТИ МИКРОМИЦЕТОВ 175

Зимилова А.А., Куклев В.Е., Сафронов В.А., Вяткин И.Н.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ COVID-19 НАСЕЛЕНИЯ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В ПЕРИОДЫ ПРЕОБЛАДАНИЯ ГЕНОВАРИАНТОВ DELTA И OMICRON 181

Скворцова О.В., Каюмов К.А., Уливанова В.А., Алексеев Д.В., Лямин А.В., Мигачева Н.Б., Исмагуллин Д.Д.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ SUTTERELLA WADSWORTHENSIS В ФЕКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЕ ДЕТЕЙ С ОЖИРЕНИЕМ 187

В помощь практическому врачу

Сейтопулу К., Стамули М., Каллиора Г., Мурзику А.

РЕДКИЙ СЛУЧАЙ ИНФЕКЦИИ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ, ВЫЗВАННОЙ BURKHOLDERIA CEPACIA 191

Некролог

ПАМЯТИ ИРИНЫ СОЛОМОНОВНЫ ФРЕЙДЛИН 195

Правила для авторов 197

Авторский указатель 200

Предметный указатель 200

CONTENTS

Reviews

Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N.

STRATEGIES FOR TULAREMIA PATHOGEN SURVIVAL, SPREAD AND VIRULENCE 9

Original articles

Chepur S.V., Paramonova N.M., Myasnikova I.A., Pluzhnikov N.N., Tyunin M.A., Kanevsky B.A., Ilyinsky N.S.

INVESTIGATING SARS-CoV-2 VIRION MATERIAL TRAFFICKING IN SYRIAN HAMSTER NEOCORTECAL NEURONS 24

Afridonova Z.E., Toptygina A.P., Semikina E.L.

SUSTAINED IMMUNOLOGICAL MEMORY TO SARS-CoV-2 ANTIGENS. THREE YEARS OF OBSERVATION 35

Konyuhov A.V., Kostinova A.M., Loktionova M.N., Kostinov M.P., Pechenik A.S.

DIFFERENCES IN COMPLETE BLOOD COUNT PARAMETERS IN PATIENTS WITH COVID-19 DIAGNOSIS BASED ON VACCINATION STATUS (LITERATURE REVIEW) 46

Iushkova S.V., Kostinov M.P., Gladkova L.S., Kameleva A.A., Kachnova A.S., Kostinova A.M., Solovyeva I.L., Andreeva N.P., Dagil Yu.A., Nastaeva N.Yu., Kryukova N.O., Loktionova M.N.

LEVEL OF INFLUENZA VIRUS STRAIN ANTIBODIES IN HEALTHY VACCINATED PEOPLE AT THE END OF THE COVID-19 PANDEMIC 57

Dolgova A.S., Kapitonova M.A., Shabalina A.V., Saitova A.T., Polev D.E., Makarova M.A., Kaftyreva L.A., Dedkov V.G.

IDENTIFICATION OF SALMONELLA ENTERICA SEROVAR TYPHI DNA BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION WITH FLUORESCENT DETECTION 66

Dyakova M.Ye., Serebryanaya N.B., Esmedlyaeva D.S., Yablonskiy P.K.

RELATIONSHIP BETWEEN THE OUTCOMES OF INTENSIVE PHASE THERAPY IN PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED INFILTRATIVE PULMONARY TUBERCULOSIS AND ACTIVITY OF PURINE METABOLISM ENZYMES AS WELL AS CD3⁺CD8⁺ LYMPHOCYTE LEVEL 77

Reingardt D.E., Ostankova Yu.V., Anufrieva E.V., Semenov A.V., Lyalina L.V., Totolian A.A.

HCV DRUG RESISTANCE MUTATIONS IN HIV-INFECTED PATIENTS 86

Hassannezhad M., Abdolsalehi M.R., Manshadi S.A.D., Asadi S.M., Shahmohamadi E., Abbaspour F., Jahani S., SeyedAlinaghi S.

CHARACTERISTICS OF CHILDREN LIVING WITH HIV IN A REFERRAL CENTER IN IRAN: A CROSS-SECTIONAL STUDY 95

Kuznetsova M.V., Sergevnin V.I., Mihailovskaya V.S., Kudryavtseva L.G., Pegyshina O.G.

MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLATES, EXTRACTED UNDER CONDITIONS OF CARDIAC SURGERY HOSPITAL 103

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

IMMUNE SYSTEM PARAMETERS IN PATIENTS WITH CHRONIC OPISTORCHIASIS BASED ON GENETIC POLYMORPHISM ASSOCIATED WITH CARBOHYDRATE AND LIPID METABOLISM DISORDERS 115

Meidani M., Khatami M., Abdollahi A., Mirzapour P., Karimian E., SeyedAlinaghi S.

SAFETY AND EFFECTIVENESS OF SINGLE- VERSUS DOUBLE-DOSE OF SEASONAL INFLUENZA VACCINE IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS: A RANDOMIZED CLINICAL TRIAL 125

Thang T.T., Canh H.D., Tu N.T.N., Thang T.D., Lan L.T.P., Loi C.B., Anh L.T.

SPECIES DISTRIBUTION AND ANTIMICROBIAL SENSITIVITY PATTERN OF ETIOLOGIC AGENTS IN PATIENTS WITH NEONATAL SEPSIS, NATIONAL CHILDREN'S HOSPITAL, HA NOI, VIETNAM, 2019–2021 133

Aldossari H.M., Abdul Salam A.

GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF COVID-19 INFECTION ACROSS SAUDI ARABIA 141

Sutriyawan A., Kurniati N., Novianti, Farida U., Yusanti L., Destriani S.N., Saputra M.K.F.

ANALYSIS OF TEMPERATURE, HUMIDITY, RAINFALL, AND WIND VELOCITY ON DENGUE HEMORRHAGIC FEVER IN BANDUNG MUNICIPALITY	155
---	------------

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

INFECTION PREVENTION AND CONTROL PROGRAMS IN ARMENIAN PSYCHONEUROLOGICAL HOSPITALS	163
---	------------

Short communications

Sivolodskii E.P., Kraeva L.A., Melnicova E.V., Gorelova G.V.

CHARACTERISTICS OF ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF ACINETOBACTER BAUMANNII bv. TRYPTOPHANDESTRUENS AND ACINETOBACTER BAUMANNII CLINICAL ISOLATES	170
---	------------

Prokopyev V.V., Kuklina N.V., Mazko O.N., Makarova O.G.

OXIDATIVE STRESS INDUCED BY THE HUMAN MICROBIOTA YEAST COMPONENT AS A MICROMYCETES PATHOGENICITY FACTOR	175
--	------------

Zimirova A.A., Kuklev V.E., Safronov V.A., Vyatkin I.N.

COMPARATIVELY ANALYZED PATTERN OF DELTA ANDOMICRON SARS-CoV-2 GENOVARIANT DOMINATED COVID-19 INCIDENCE IN THE POPULATION OF THE SARATOV REGION	181
---	------------

Skvortsova O.V., Kaiumov K.A., Ulivanova V.A., Alekseev D.V., Lyamin A.V., Migacheva N.B., Ismatullin D.D.

PREVALENCE OF SUTTERELLA WADSWORTHENSIS IN THE FECAL MICROBIOTA OF OBESE CHILDREN	187
--	------------

For the physicians

Seitopoulou C., Stamouli M., Kalliora G., Mourtzikou A.

A RARE CASE OF URINARY TRACT INFECTION BY BURKHOLDERIA CEPACIA	191
---	------------

Obituary

IN MEMORY OF IRINA S. FREIDLIN	195
---	------------

Instructions to Authors	197
--------------------------------------	------------

Author index	200
---------------------------	------------

Subject index	200
----------------------------	------------

СТРАТЕГИИ ВЫЖИВАНИЯ, РАСПРОСТРАНЕНИЯ И ВИРУЛЕНТНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

Т.Ю. Кудрявцева, А.Н. Мокриевич

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия

Резюме. Бактерия *Francisella tularensis* — этиологический агент туляремии, природно-очаговой, особо опасной инфекции, которая, «благодаря» низкой инфекционной дозе и способности передаваться человеку всеми возможными путями, является потенциальным агентом биотерроризма. Человечеству уже более ста лет известен этот возбудитель, однако до сих пор предотвратить массовые вспышки заболевания людей не удастся, а для подтверждения диагноза «туляремия» требуется от нескольких дней до нескольких недель. Диагностика туляремии и лечение, особенно при спорадической заболеваемости, из-за полиморфизма клинических симптомов, разнообразной локализации инфекционного процесса и множественной природной устойчивости возбудителя ко многим антимикробным препаратам вызывает очень большие затруднения. Основа вирулентности возбудителя туляремии — способность нарушать функцию фагоцитов. В организме животного и человека различные бактериальные системы туляремийного микроба работают вместе, чтобы обойти иммунную систему, прикрепиться к эукариотическим клеткам и проникнуть в них, блокировать слияние фагосомы с лизосомой, размножиться в различных клетках хозяина, не будучи обнаруженными, ингибируя свое уничтожение и вызывая гибель клеток-хозяев для высвобождения бактерий и инфицирования соседних клеток тканей, развивая таким образом инфекционное заболевание в разных органах. Для этого служат и уникальный, зависящий от комплемента, процесс проникновения в клетку хозяина, названный петлевым фагоцитозом, и необычный инертный эндотоксин, и варьирование разнообразных модификаций форм «свободного» липида А и липида А в составе ЛПС, и динамическое регулирование длины его ацильных цепей, и специфичная комбинация регуляторных факторов для индукции синтеза белков «острова патогенности». Накопленные точечные мутации, внутригеномные перестройки, делеции, вставки, дубликации, транспозиции, дегградация генов, варьирование числа копий в повторяющихся последовательностях ДНК, а также гомологичная и негомологичная рекомбинации являются основой значительного расширения возможностей существования возбудителя туляремии: способствуют выживанию штаммов голарктического подвида в различных условиях, в том числе в условиях осмотического шока, формируют множественную устойчивость к различным токсическим веществам, меняют вирулентность подвидов *F. tularensis*. Анализ значительного количества публикаций по каждому из перечисленных аспектов жизнедеятельности возбудителя туляремии —

Адрес для переписки:

Мокриевич Александр Николаевич
142279, Россия, Московская область, Серпуховский р-н,
п. Оболенск, ФБУН Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии.
Тел.: 8 (4967) 36-01-17 (служебн.); 8 (905) 780-61-61 (моб.).
E-mail: mokrievich@obolensk.org

Contacts:

Alexander N. Mokrievich
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District,
Obolensk, State Research Center for Applied Microbiology
and Biotechnology.
Phone: +7 (4967) 36-01-17 (office); +7 (905) 780-61-61 (mobile).
E-mail: mokrievich@obolensk.org

Для цитирования:

Кудрявцева Т.Ю., Мокриевич А.Н. Стратегии выживания,
распространения и вирулентности возбудителя туляремии //
Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 9–23. doi: 10.15789/2220-
7619-SFT-17576

Citation:

Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N. Strategies for tularemia pathogen
survival, spread and virulence // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 9–23. doi: 10.15789/2220-
7619-SFT-17576

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на период 2021–2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней» (Пер. № ЕГИСУ НИОКТР 121021500051-2).

The study was carried out within the framework of the industry research program of Rosпотребнадзор for the period 2021–2025 “Scientific support of epidemiological surveillance and sanitary protection of the territory of the Russian Federation. Creation of new technologies, means and methods of control and prevention of infectious and parasitic diseases” (No. 121021500051-2).

попытка объединения отличий, особенностей строения и «уловок» клеток вида *F. tularensis*, позволяющих данным бактериям являться мощным патогеном, обладать высокой способностью к адаптации при низкой изменчивости возбудителя и ограниченном геноме по сравнению с другими особо опасными бактериями.

Ключевые слова: *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, вирулентность, эндотоксин, внутриклеточная локализация и репликация, множественная лекарственная устойчивость.

STRATEGIES FOR TULAREMIA PATHOGEN SURVIVAL, SPREAD AND VIRULENCE

Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N.

State Research Center for Applied Biotechnology and Microbiology, Obolensk, Russian Federation

Abstract. The bacterium *Francisella tularensis* is the etiological agent of tularemia, a natural focal, especially dangerous infection, which, “thanks to” its low infectious dose and ability to be transmitted to humans via all possible routes, is a potential bioterrorism agent. This pathogen has been known to mankind for over a hundred years, but it is still impossible to prevent massive human disease outbreaks and sporadic incidence cases, whereas tularemia diagnosis may be verified within several days-to-weeks. The basis for tularemia causative agent virulence is based on its ability to disrupt phagocyte function. In animals and humans, the various *Francisella tularensis* systems work together to bypass host immune system, attach to and enter eukaryotic cells, block phagosome-lysosome fusion, multiply in various host cells without being detected, inhibit their destruction and cause host cell death to release bacteria and infect neighboring tissue cells, thus developing an infectious disease in different organs. This is achieved through a unique complement-dependent penetration process into host cell, called loop phagocytosis, and an unusual inert endotoxin as well as variation in diverse forms of “free” lipid A modifications and lipid A in the LPS composition, its dynamic acyl chain length regulation, and specifically combined regulatory factors to induce the “pathogenicity island” protein synthesis. Accumulated point mutations, intragenomic rearrangements, deletions, insertions, duplications, transpositions, gene degradation, variation in the number of copies in repeated DNA sequences, as well as homologous and non-homologous recombinations underlie a markedly expanded potential for existence of the tularemia causative agent: they contribute to the holarctic subspecies strain survival in varying conditions, including osmotic shock, to form multiple resistance to various toxic substances and alter *F. tularensis* subspecies virulence. Analyzing a whole body of publications on the abovementioned aspects for tularemia causative agent life activity attempts to combine the differences, structural features and “tricks” of the *F. tularensis* species cells allowing them to be a powerful pathogen, with a high potential to adapt upon low pathogen variability and a limited genome length compared with other specially dangerous bacteria.

Key words: *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, virulence, endotoxin, intracellular localization and replication, multidrug resistance.

Экологическая стабильность

Francisella tularensis — мелкий, грамотрицательный, неподвижный, факультативный внутриклеточный бактериальный патоген — имеет впечатляющий диапазон хозяев, который включает сотни видов: позвоночных (в основном, это грызуны и зайцы), беспозвоночных (в основном это членистоногие) и даже свободноживущих простейших [3, 5, 54, 87, 132]. Наличие нескольких хозяев (полигостальность) и переносчиков (поливекторность) у микроорганизма обеспечивает устойчивость паразитарной системы за счет интенсивной циркуляции возбудителя, особенно в условиях высокой численности носителей. Например, в 2022 г. в процессе эпизоотолого-эпидемиологического мониторинга на территории Российской Федерации было выявлено 42 вида мелких млекопитающих и 13 видов клещей, инфицированных возбудителем туляремии [1].

Наиболее распространены в мире и на территории России штаммы вирулентного для человека и животных подвида *F. tularensis* subsp.

holarctica, которые выделяются на территориях различных природных очагов Европы, Азии, Северной Америки, Австралии, от водных до пустынных, со своими хозяевами и переносчиками [32, 55, 93, 111, 113].

В природе имеется огромное разнообразие микроорганизмов, из которого культивируемые в искусственных условиях бактерии составляют около 1% [4]. Клетки возбудителя туляремии, по-видимому, занимают промежуточное положение. Бактерию, находящуюся в объектах внешней среды, можно видеть в микроскоп, обнаруживать иммунологическими методами и выявлять ДНК возбудителя с помощью ПЦР, но вырастить культуру возбудителя туляремии из воды, членистоногих, инфицированных предметов на искусственной питательной среде практически не удается. Однако введение суспензии этих образцов чувствительному животному, например, мыши, приводит к развитию типичного заболевания, и при высеве из органов погибшего или эвтаназированного грызуна медленно, в течение 2–3 дней, вырастают колонии возбудителя туляремии. Показано,

что во внешней среде бактерия переходит в инфекционное, жизнеспособное, но «некультивируемое» состояние, сохраняя при этом способность реверсии в вегетативные вирулентные формы при изменении условий существования [21, 43]. При этом более древние авирулентные бактерии — подвид *F. tularensis* subsp. *novicida* и вид *F. philomiragia* — культивируются на искусственных питательных средах из воды естественных водоемов и других объектов окружающей среды [2, 19, 121]. Эпизоотический процесс в природном очаге туляремии складывается из двух составляющих: сохранения возбудителя в межэпидемический период и циркуляции возбудителя в эпидемический период. Между вспышками возбудитель сохраняется в окружающей среде в неактивном состоянии практически без репликации. Этим объясняют идентичность генотипа при возникновении вспышки через десятилетия [10, 118].

F. tularensis имеет низкую метаболическую активность, что говорит о том, что это зависящий от хозяина патоген. Показана возможность существования популяции бактерий в водно-болотной среде, насыщенной простейшими, с высокой питательной доступностью [87, 105].

Способность выдерживать осмотический шок при переходе от внутриклеточного образа жизни к существованию в соленой и пресной воде значительно расширила возможности распространения и выживания голарктического подвида по сравнению с другими вирулентными подвидами. Канал, который действует как «клапан сброса давления», кодируется консервативным геном (FTL_1753), с единственной из 165 аминокислот заменой между штаммами подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *F. tularensis* subsp. *tularensis* [131]. Способность клеток возбудителя туляремии *F. tularensis* subsp. *holarctica* существовать в природных водоемах является ключевым моментом не только для выживания бактерии, но и для ее более широкого распространения, сохранения и взаимодействия с развивающимися в воде простейшими и личинками насекомых [20, 21].

Показано, что возбудитель туляремии не размножается в клещах, насекомых, не передается трансвариально, но при питании кровью больных туляремией животных членистоногие способны сохранять микроорганизм длительное время и передавать его при укусах другому животному и человеку. Комары получают туляремийный микроб через личинку, которая развивается в инфицированной воде, или питаясь кровью инфицированного животного [6, 11, 73, 120].

Бактерии *F. tularensis* subsp. *holarctica* являются мощным патогеном, обладают высокой способностью к адаптации при низкой изменчивости возбудителя и чрезвычайно ограни-

ченном геноме по сравнению с другими особо опасными бактериями. Так, геном возбудителя туляремии состоит из одной хромосомной ДНК размером около 1,9 Mbp (megabases), в то время как геном *Yersinia pestis* состоит из хромосомы размером 4,65 Mbp и трех плазмид вирулентности 96,2 kb (в среднем 1,8 копий на клетку), 70,3 kb (4,3 копии на клетку) и 9,6 kb (186 копий на клетку) [88]. Геном возбудителя сибирской язвы состоит из хромосомы размером 5,23 Mbp и двух плазмид вирулентности pXO1 = 181 677 kbp, в среднем 3 копии плазмиды на клетку, и 2 копии pXO2 = 94 830 kbp [102]. Бактерии *Brucella melitensis* имеют две хромосомы размером 3 294 931 Mbp (2 117 144 Mbp и 1 177 787 Mbp) [40].

Общий механизм приобретения генетической изменчивости у бактерий чаще всего происходит путем горизонтального переноса генов. Это показано для многих видов бактерий. Штаммы вирулентных для человека и животных подвида *F. tularensis* отличаются от многих грамотрицательных микроорганизмов тем, что не содержат плазмид. У вирулентных подвида *F. tularensis* генетическая вариабельность, в том числе устойчивость к токсическим атакам внешней среды и продуктам жизнедеятельности других организмов, возникла в результате мутаций, а не приобретения новых генов с помощью плазмид [23].

Проведенный *in silico* анализ показал, что штаммы *F. tularensis* subsp. *novicida* обладают системой CRISPR/Cas для защиты от вторжения генетических элементов, но у трех вирулентных для человека подвида *F. tularensis* (*tularensis*, *holarctica* и *mediasiatica*) гены, ответственные за систему CRISPR/Cas, не функциональны [52].

Все близкородственные представители рода *Francisella* обнаруживают значительную перестройку своих геномов по отношению друг к другу [91]. Чумной микроб и возбудитель туляремии являются двумя яркими примерами резкого увеличения количества IS-элементов и хромосомных перестроек, опосредованных этими повторяющимися последовательностями, в популяциях, которые в противном случае имеют очень мало полиморфизмов. Интерпретация повышенной частоты таких изменений заключается в том, что большая часть генома освобождается от селективного давления из-за «сдвига ниши», в которой оказался микроорганизм. В относительно узкой новой нише большая часть генома больше не нужна и открыта для случайных мутаций [14, 24, 69].

Показано, что в результате эволюции свободноживущие авирулентные более древние виды *F. philomiragia* и *F. novicida* превратились в патогенные, зависимые от хозяина штаммы подвида *F. tularensis*, и этот процесс сопровож-

дался значительной, независимой потерей функций генов и приобретением элементов вставок, обеспечивающих механизмы транслокации при геномных перестройках, которые в большинстве случаев относятся к гомологичной рекомбинации [103, 128]. Показано, что патогенные штаммы отличаются на 148 генов, которые были детектированы только в свободноживущих штаммах, у вирулентных подвидов *F. tularensis* отсутствуют пути биосинтеза ряда аминокислот, а также снижена экспрессия 352 генов по сравнению со свободноживущими штаммами подвида *F. novicida* [85, 110].

Особенностью рода *Francisella* является необычный состав жирных кислот и высокое содержание липидов в клеточной стенке [33, 112].

Бактерия подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica* способна менять свой стиль жизни на внутриклеточный, персистирующий, «некультивируемый», симбиотический или свободноживущий, в зависимости от среды, в которую она попадает [20, 53, 73].

Высокая инвазивность

F. tularensis является высокоинфекционным организмом. Вдыхание всего 10 колониеобразующих единиц достаточно, чтобы вызвать заболевание у людей со смертельным исходом в 30–60% случаев при неправильном лечении [66].

Возбудитель туляремии способен проникать в организм человека и животного всеми возможными путями: трансмиссивным, контактным, алиментарным и аэрогенным, но инфекция не контагиозна — не передается от человека человеку. В организме человека микроб размножается в месте входных ворот, вызывая некротическую воспалительную реакцию с развитием на коже — язвы, на миндалинах — некротической ангины, в легких — очаговой некротической пневмонии, все состояния сопровождаются воспалением регионарных лимфатических узлов [113].

Бактерия проникает в различные типы клеток. Помимо макрофагов, *F. tularensis* может инфицировать полиморфно-ядерные нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки, эндотелиальные и альвеолярные эпителиальные клетки типа II, гепатоциты и даже эритроциты [18, 46, 49, 58, 72, 78, 81, 94, 107, 108].

Используя линию макрофагоподобных клеток человека (ГНР-1), показали, что бактерии *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 и subsp. *holarctica* LVS проникают в макрофаги человека посредством уникального, зависящего от комплемента процесса, названного петлевым фагоцитозом [28].

Прилипание и поглощение *F. tularensis* макрофагами сильно зависит от рецепторов комплемента и от сыворотки с интактным фактором комплемента С3. Комплемент и рецепто-

ры комплемента играют доминирующую роль в опосредовании эффективного поглощения вирулентных подвидов *F. tularensis* [64, 65]. При не опсоническом поглощении штаммов *F. tularensis* значительную роль играет фагоцитарный рецептор маннозы, который обеспечивает бактерию средствами для ограничения поглощения бактерицидными фагоцитами [28].

Внутриклеточная локализация и репликация

Возбудитель туляремии не только проникает, но и реплицируется в цитозоле клеток эукариотического хозяина. После захвата макрофагами посредством уникального петлевого фагоцитоза бактерии первоначально находятся внутри фагосомы, связанной с мембраной. Поглощение требует актиновых микрофиламентов, образующих фибриллярное покрытие фагосомы, которое защищает от слияния с лизосомой и способствует ограниченному приобретению лизосомных маркеров [28, 30].

После поглощения туляремийного микроба макрофагами млекопитающих фагоцитарная вакуоль не перерастает в фаголизосому, а превращается сначала в раннюю эндосому, затем в позднюю эндосому, которые характеризуются специфическими маркерами. С помощью привлечения протонного насоса происходит снижение рН среды, разрушение фагосомальной мембраны и выход микробов в цитозоль, где и происходит репликация [27, 29]. Короткое время, проведенное в фагоцитарной вакуоли (30–60 мин), является противомикробным средством защиты, от активных форм кислорода и антимикробных пептидов [59]. Поздние этапы внутриклеточной пролиферации сопровождаются гибелью инфицированных макрофагов или здоровых клеток, что опосредуется универсальным путем апоптоза или пироптоза [18, 87]. За ним следует выход бактерий из клетки.

Чтобы избежать слияния фагосомы с лизосомой, бактерии *F. tularensis* активируют свою систему секреции, подобную типу VI (type 6 secretion system, T6SS), которая кодируется островом патогенности (FPI). Регуляторные гены и локус, называемый «островом патогенности», включает в себя в штаммах патогенных подвидов возбудителя туляремии два повтора от 16 до 19 генов, ответственных за синтез соответственного числа секретируемых белков «острова патогенности», которые играют важную роль в способности микроорганизма избегать фагоцитоза и размножаться в иммунных клетках организма хозяина [67, 83, 84].

Необходимым этапом вирулентности *F. tularensis* является выход клеток из фагосо-

мы в цитозоль, где бактерия способна быстро делиться и распространяться в окружающие ткани. Для этого *F. tularensis* использует регуляторную схему для активации патогенеза посредством индукции синтеза белков «острова патогенности», которая включает уникальную РНК-полимеразу, состоящую из двух крупных субъединиц, и уникальную комбинацию регуляторных факторов. Ключевую роль играет гетеродимер MglA (macrophage growth locus protein A) и SspA (stringent starvation protein A), который выполняет две роли в активации генов вирулентности. Включает функцию активации посредством комплекса RNAP σ 70-(MglA-SspA) с фактором специфичности, необходимым для распознавания промотора (σ 70) и основной β '-субъединицей РНК-полимеразы (RNAP). Дополнительным активатором транскрипции генов острова патогенности является комплекс (MglA-SspA) — ppGpp (стрессовый алармон, гуанозин тетрафосфат) — PigR (pathogenicity island gene regulator) [122].

Способность поражать и размножаться в различных клетках-хозяевах представляется одной из главных особенностей экологии и эпидемиологии *F. tularensis*. После инфицирования эукариотических клеток бактерии *F. tularensis* быстро диссеминируют в нормальные здоровые клетки селезенки, печени, легких, лимфатических узлов и костного мозга и размножаются в этих органах [34, 36, 44, 70].

Поскольку эритроциты не способны к фагоцитозу или эндоцитозу, остается неизвестным, как *F. tularensis* проникает в эти клетки. Более того, последствия заселения во внутриклеточном пространстве эритроцитов не определены. Известно только, что пребывание в эритроците увеличивает способность *F. tularensis* колонизировать клещей. Эритроцит защищает бактерии от среды с низким pH, аналогичной среде кишечных клеток питающегося клеща. Исследования показали, что система секреции *F. tularensis* типа VI (type 6 secretion system, T6SS) необходима для инвазии эритроцитов, поскольку мутация *mglA* (регулятора транскрипции генов T6SS), *dotU* или *iglC* (два гена, кодирующих механизм T6SS) резко снижает проникновение бактерий в эритроциты [107].

У туляремийного микроба отсутствуют экзотоксины (система секреции типа III). Вместо этого *F. tularensis* повреждает ткани путем инвазии и разрушения. Неконтролируемый рост в системных органах приводит к повреждениям клеток, гиперсекреции цитокинов и смерти от цитокинового шторма [37, 38].

Защитный иммунитет, вызванный естественной инфекцией *F. tularensis* или вакцинацией штаммом LVS у людей, зависит в первую

очередь от клеточно-опосредованных иммунных ответов Th1-типа, включая интерферон-гамма, фактор некроза опухоли-альфа и интерлейкин-12 [57]. По сей день остается большой пробел в понимании роли В-клеток и их продуктов — антител и цитокинов — в опосредовании защитного ответа на инфекцию, вызванную *F. tularensis* [64, 65].

Несмотря на хорошо известную роль пилей в адгезии, агрегации, подвижности и поглощении ДНК другими грамотрицательными бактериями (система секреции типа IV), подобные функции не приписываются роговидным выступам на поверхности бактерий *F. tularensis* [24, 41, 42].

Необычный, инертный эндотоксин

Молекулы липополисахарида (ЛПС, эндотоксин) грамотрицательных бактерий играют решающую роль в поддержании целостности внешней мембраны, регуляции проницаемости клеток, регуляции иммунных ответов хозяина, устойчивости к антимикробным пептидам, устойчивости к антителам хозяина и предотвращении активации комплемента. Мутанты, лишенные ЛПС, часто проявляют фенотипы, которые включают снижение жизнеспособности, медленный рост и потерю вирулентности. Установлена тесная связь между строением ЛПС клеток *F. tularensis* subsp. *holarctica* и уклоном от иммунной системы хозяина. Все изменения эндотоксина возбудителя туляремии приводят к очень низкому уровню токсичности ЛПС и отсутствию иммунного распознавания липида А клеток *F. tularensis*. Иммунный ответ организма млекопитающего, чувствительного к возбудителю туляремии, или опаздывает, или значительно слабее, чем нужно [58].

Липополисахарид *F. tularensis* состоит из 1) липида А, который прикрепляет ЛПС к внешней мембране; 2) ядра, или корового олигосахарида (Kdo), и 3) O-полисахарида (также известного как O-антиген), который содержит различное количество повторяющихся единиц тетрасахарида. ЛПС клеток возбудителя туляремии необычен по сравнению с ЛПС других грамотрицательных бактерий, поскольку он не может активировать Toll-подобный рецептор 4 (TLR4) при всех температурах роста, который в значительной степени ответствен за воспаление в ответ на бактериальный эндотоксин [51, 71].

Распознавание липида А как чужеродного является важным признаком защиты организма млекопитающих. Многие клетки, такие как макрофаги эпителиальные клетки, распознают липид А с помощью механизмов врожденного иммунитета. В отличие от других, липид А

F. tularensis subsp. *holarctica* является очень слабым стимулятором врожденного иммунитета хозяина. Отсутствие иммунного распознавания липида А клеток *F. tularensis* объясняется несколькими структурными различиями по сравнению с мощным иммунным активатором — липидом А *E. coli*. Во-первых, липид А клеток возбудителя туляремии является тетраацилированным по сравнению с гексаацилированным липидом А, обычно встречающимся у большинства грамотрицательных микроорганизмов. Во-вторых, ацильные цепи липида А бактерий *F. tularensis* subsp. *holarctica* имеют длину от 16 до 18 атомов углерода по сравнению с цепями длиной от 12 до 14 атомов углерода обычного ЛПС. В-третьих, липид А клеток возбудителя туляремии является либо нефосфорилированным, либо монофосфорилированным (в положении 1'), по сравнению с прототипом липида А, который фосфорилирован в положениях 1' и 4' диглюкозаминового остова. В-четвертых, патоген маскирует свой 1'-фосфат, если он присутствует, путем добавления галактозамина (рис. 1). Снижение или отсутствие отрицательно заряженных фосфатов, вероятно, влияет на общий заряд ЛПС бактерий *F. tularensis*, частой мишени катионных антимикробных пептидов, и придает устойчивость к противомикробным пептидам [71, 86, 92, 98, 99, 123, 127].

Менее распространенные варианты липида А *F. tularensis* могут иметь различные модификации состава сахара, как показано пунк-

тирными кружками (В). Изменение длины ацильных цепей (14/16/18) при различных температурах указана в скобках (GlcN — глюкозамин, GalN — галактозамин).

Ген N-ацил-трансферазы LpxD1 приводит к включению более длинных ацильных цепей (длиной 18 атомов углерода) во 2 и 2' положениях липида А, тогда как экспрессия ферментов LpxD2 добавляет жирные кислоты с более короткой цепью (16 атомов углерода в длину) в тех же местах. Динамическое регулирование длины ацильной цепи липида А с помощью ферментов LpxD1/LpxD2 при различных температурах, по-видимому, важно для поддержания проницаемости мембран и восприимчивости к катионным антимикробным пептидам [71].

Кроме того, необычным оказалось то, что от 60 до 95% общего липида А существует в «свободной» форме, в которой отсутствуют коровый олигосахарид и полисахариды О-антигена [13, 68, 129].

В отличие от липида А, который присоединен к ядру и О-антигену, «свободный» липид А находится в двух формах, обе из которых содержат 1'-фосфат, модифицированный галактозамином, при этом А1 (без глюкозы), а А2 с глюкозой или маннозой в 6'-положении [129]. Способность клеток возбудителя туляремии реплицироваться внутриклеточно, сопротивляться противомикробным препаратам в фагосоме и вызывать заболевание требует разнообразных модификаций свободного липида А и липида А в составе ЛПС [59, 62].

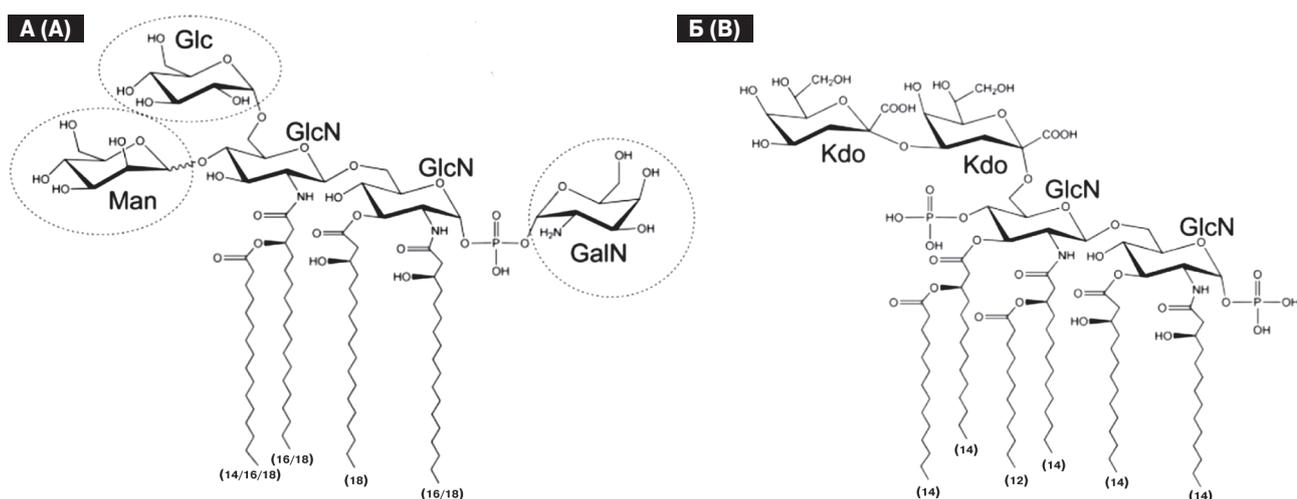


Рисунок 1. Сравнение строения липида А *F. tularensis* (А) и *E. coli* (Б) [86]

Figure 1. Comparison of the *F. tularensis* (A) and *E. coli* (B) lipid A structure [86]

Примечание. Менее распространенные варианты липида А *F. tularensis* могут иметь различные модификации состава сахара, как показано пунктирными кружками (А). Изменение длины ацильных цепей (14/16/18) при различных температурах указана в скобках (GlcN — глюкозамин, GalN — галактозамин).

Note. Less common *F. tularensis* lipid A variants may have different sugar composition modifications denoted by the dotted circles (A). The change in acyl chain length (14/16/18) at varying temperatures is indicated in parentheses (GlcN — glucosamine, GalN — galactosamine).

В модификации ЛПС наружной мембраны центральная роль принадлежит семейству флиппаз, которое включает белки, переносящие липид-связанные компоненты оболочки через мембрану. FlmX представляет собой флиппазу для модификации свободного липида А у *Francisella*. FlmX влияет на ядро и структуру О-антигена ЛПС. FlmX необходим для патогенеза высоко-вирулентных штаммов. Дефицит гена *flmX*, кодирующего флиппазу FlmX, вызывает дефекты модификации липида А, ремоделирования ядра и добавления О-антигена. Было обнаружено, что мутант *F. tularensis*, лишенный *flmX*, аттенуирован более чем в 1 000 000 раз, и не может противостоять врожденному антимикробному действию пептида LL-37 и антибиотика полимиксина [26].

Коровый олигосахарид (KDO) обеспечивает присутствие О-антигена на поверхности клетки. У большинства грамотрицательных бактерий липид А связан с ядром через две молекулы KDO. Необычной особенностью корового региона ЛПС клеток возбудителя туляремии является наличие единственной единицы KDO (восьмиуглеродного сахара, 3-дезоксид-маннооктулозоновой кислоты (3-deoxy-D-manno-octulosonic acid), присоединенной к липиду А [86, 125, 126, 127].

О-полисахарид. Бактериальные О-антигены, как известно, вызывают сильный ответ антител из-за их повторяющейся структуры и конститутивной экспрессии. О-антиген штаммов подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica* идентичен штаммам подвида *F. tularensis* subsp. *tularensis* и состоит из четырех повторяющихся сахаров, но отличается от такового у *F. tularensis* subsp. *novicida* [130]. Как и у многих других бактериальных патогенов, О-антиген клеток *F. tularensis* subsp. *holarctica* играет роль в сопротивлении действию сыворотки крови. Мутанты *F. tularensis*, в которых отсутствует О-полисахарид, очень чувствительны к уничтожению комплементом сыворотки. Антитела к О-антигену обеспечивают защиту мышей, зараженных штаммом LVS [31], но не защищают от заражения штаммами *F. tularensis* subsp. *tularensis* [35].

Капсула. Электронно-плотный поверхностный материал, напоминающий капсулу, был продемонстрирован вокруг клеток вирулентных подвигов *F. tularensis* с помощью электронной микроскопии, что привело к выводу, что эти подвиды могут быть инкапсулированы. Однако эти электронно-плотные поверхностные структуры не всегда видны, что позволяет предположить, что этот капсулоподобный комплекс активируется в определенных условиях роста или окружающей среды. Детальный анализ капсулы *F. tularensis* выявил полисахарид, идентичный О-антигенной субъединице LPS [9]. Капсула обычно защищает бактерии

от комплемент-опосредованного лизиса, фагоцитоза и иммунного распознавания. Капсула блокирует связывание IgM и компонента С3 комплемента. Для внутриклеточного патогена, такого как *F. tularensis*, антифагоцитарные свойства капсулы могут показаться контрпродуктивными, и возможно именно поэтому синтез капсулы подавляется. Однако возможно, что изменяя синтез поверхностных структур капсулы, патоген манипулирует механизмами проникновения в клетку-хозяина и внутриклеточного транспорта, чтобы ограничить воспаление и способствовать внутриклеточному выживанию [39, 45]. Есть данные, что различные капсулоподобные вещества могут продуцироваться разными штаммами *F. tularensis* и что состав капсул может варьироваться в зависимости от условий культивирования или факторов окружающей среды. Если действительно существуют различные композиции капсул, эти варианты могут быть важной частью общей стратегии вирулентности возбудителя туляремии [12].

В геноме клеток *F. tularensis* найден локус из трех генов, *capBCA*, гомологичный локусу капсулы поли- γ -D-глутаминовой кислоты возбудителя сибирской язвы *B. anthracis*. Однако локус не участвует в синтезе капсулы, а показано, что ген *capA* может кодировать интегральный белок внутренней мембраны, который взаимодействует с CapB и CapC для экстрацеллюлярного экспорта углеводов [76]. Локус *capBCA* консервативен для штаммов типа А и В, а исследования мутагенеза в штаммах Schu S4 и LVS подтвердили, что мутанты *capBCA* или *capB* были аттенуированы как *in vitro*, так и *in vivo* [56, 80, 115].

Поскольку оболочка является самым наружным слоем *F. tularensis*, многие исследования были направлены на идентификацию и характеристику компонентов оболочки, учитывая их потенциальное воздействие на поверхность, вероятное прямое взаимодействие с молекулами клетки-хозяина и способность эффективно проникать через мембраны эукариот (рис. 2, II обложка). Было обнаружено, что клетки возбудителя туляремии содержат свыше 20 белков наружной мембраны (ОМР), из которых не менее десяти требуются для вирулентности. Белки наружной мембраны TolC (FTL_1865), FtlC (FTL_1107) и SilC (FTL_0686) функционируют как система секреции типа I для высвобождения эффекторных молекул и их доставки в клетку-хозяина. Гибридный белок FurA/B (FTL_0439), необходимый для внутриклеточного выживания, является транспортером железа [101, 109]. Интересно, что *furA/B* в штамме LVS является результатом делеции 1,5 т.п.н. между двумя генами, обнаруженными у вирулентных штаммов *Francisella*, которые участвуют в транспорте железа [100]. Белок наружной мембраны, липопротеин Flpp3 (FTL_0645), необходим для

выживания патогена в легких мыши [115], стимулирует TLR2, взаимодействует с антисывороткой [89]. Белок OmpA (FTL_0325) подавляет провоспалительные цитокиновые ответы в клетках-хозяевах [75]. Экспонируемый на поверхности белок FsaP (FTL_1658) важен для прилипания к эпителиальным клеткам [79]. Белок наружной мембраны DsbA (FipB) (FTL_1096) является бифункциональным белком, обладающим как оксидоредуктазной, так и изомеразной активностью для правильного образования сложных дисульфидных связей с более чем 50 субстратами, включая и другие белки наружной мембраны, такие как DipA (FTL_1306), ForA (FTL_1328), OmpA, белки острова патогенности и 25 гипотетических белков [94, 95, 96, 97, 104, 106, 119]. Дальнейшие исследования по идентификации и характеристике белков наружной мембраны помогут лучше понять высокую вирулентность возбудителя туляремии.

Капсула *F. tularensis*, идентичная O-антигену ЛПС, блокирует связывание антител и компонента С3 комплемента. ЛПС *F. tularensis* отличается тем, что он тетраацелирован, имеет длинноцепочечные ацильные цепи (длиной 16–20 атомов углерода), либо не фосфорилирован, либо монофосфорилирован, а также является слабым агонистом TLR4. Пили типа IV образуют роговидные выступы на поверхности бактерий, и хотя они коррелируют с вирулентностью точная функция пилей типа IV *F. tularensis* неизвестна. Система секреции типа VI, кодируемая Francisella Pathogenicity Island (FPI), включает два повтора от 16 до 19 генов, ответственных за синтез соответствующего числа секретлируемых белков «острова патогенности». *F. tularensis* секретирует также различные белки, включая AspA, KatG и SodB, но механизмы их секреции неизвестны. Наружная мембрана (OM) *F. tularensis* содержит много наружных мембранных белков (OMP) и липопротеинов наружной мембраны (OMLps), которые необходимы для вирулентности. Периплазматические белки и белки внутренней мембраны (IMPs) также играют роль в вирулентности *F. tularensis*, но о них известно гораздо меньше.

Врожденная множественная лекарственная устойчивость

Для того, чтобы выжить, микроорганизмы должны быть в состоянии пережить токсические атаки и продукты жизнедеятельности других организмов и быть способными справиться с различными ядовитыми веществами (дезинфекционными и моющими средствами, антибиотиками, красителями, тяжелыми металлами, растворителями). Множественная природная устойчивость к различным токсическим

веществам в клетках *F. tularensis* обусловлена не приобретением плазмид, а является результатом мутаций, которые произошли в генах, кодирующих регуляторы, мишени, переносчики и ферменты, модифицирующие противомикробные препараты [48, 61, 77].

Возбудитель туляремии, *Francisella tularensis*, проявляет значительную чувствительность только к трем основным группам антибиотиков — тетрациклам, аминогликозидам и фторхинолонам. Однако почти в 25% случаев лечение заболевших туляремией относящимися к этим группам антибиотиками оказывалось также неэффективным [17, 22, 90]. Напомним, подвид *holartctica* имеет врожденную устойчивость к пенициллинам, полимиксинам, цефалоспорином, линкозамидам (клиндамицину), ко-тримоксазолу (сульфаметоксазола триметоприму). К макролидам, карбопенемам, монобактамам (азтреонему) наблюдается штамм-зависимая устойчивость изолятов голарктического подвида.

Частичная устойчивость к антибиотикам, которые используются для лечения туляремии обусловлена разными причинами. В случае фторхинолонов — это индуцированные антибиотиком мутации в бактериальных гиразах типа II GyrA и GyrB, а также мутации в топоизомеразах типа IV ParE или ParC (мишенях лекарственного средства), которые придают повышенную устойчивость патогена к фторхинолонам [116, 117].

Гентамицин не способен проникать через мембрану, поэтому внутриклеточная локализация возбудителя в организме человека или животного — это защита от данного лекарственного средства, но любые внеклеточные, нефагоцитированные бактерии будут уничтожены гентамицином. Хотя известны белки, модифицирующие аминогликозиды, у представителей других родов, но у *Francisella* они отсутствуют. Известные механизмы устойчивости *Francisella* к аминогликозидам основаны на эффлюксной помпе.

Наиболее распространенными бактериальными механизмами, вовлеченными в резистентность, являются снижение проницаемости наружной мембраны и естественная и индуцированная активность эффлюксных насосов [114]. Виды *Francisella* содержат гены очень небольшого числа насосов. В целом существует три тесно связанных, перекрывающихся насоса, классифицируемых как системы секреции I типа (T1SS), которые представляют собой ассоциацию белка оттока наружной мембраны, периплазматического белка, называемого белком слияния мембран (MFP, membrane fusion protein) и белком-транспортером. Геном *F. tularensis* содержит опероны, кодирующие 3 ортолога белков оттока наружной мембраны — TolC, FtlC и SilC [8, 74]. Делеция *tolC* (FTL_1865) или его го-

мологов в штамме LVS приводит к повышенной чувствительности ко многим антибиотикам [47]. Насос оттока, содержащий белок внешней мембраны TolC/AcrA/AcrB, играет важную роль в обеспечении устойчивости к эритромицину, SDS и устойчивости к аминогликозидам и гликотрипептидам [63]. Другой TolC-подобный белок, FtlC (FTL_1107), частично отвечает за антибиотико-резистентность к канамицину и стрептомицину. Насос оттока с участием ортолога SilC/EmrA1/EmrB (FTL_0686, FTL_0687, FTL_0688) играет важную роль в устойчивости к стрептомицину и неомицину [8].

Мишенью действия бета-лактамовых антибиотиков является синтез клеточной стенки бактерии. Устойчивость возбудителя туляремии к бета-лактамовым антибиотикам связывают с действием трех механизмов. Это нарушение проницаемости внешней мембраны с помощью ЛПС, действием четырех пенициллин-связывающих белков (PBP) и их активатора (LpoB), а также ферментативное разложение лекарственного средства сериновыми бета-лактамазами класса A [16].

Устойчивость к полимиксинам связывают с модификацией анионных фосфатных групп липида А возбудителя туляремии положительно заряженными фрагментами, такими как галактозамин, что приводит к уменьшению отрицательного поверхностного заряда и отталкиванию катионных противомикробных препаратов [71].

Механизмом устойчивости к эритромицину является модификация гена *rrl* 23S рибосомальной РНК. Введение точечной нуклеотидной замены цитозина на аденин в положении 2059 трех копий этого гена сделало чувствительные к эритромицину штаммы *F. tularensis* устойчивыми. Эта мутация оказалась генетической основой биоварной, фенотипической и таксономической дифференциации большой филогенетической группы В.12 штаммов голарктического подвида [60].

Поскольку *F. tularensis* является факультативной внутриклеточной бактерией, любой предлагаемый антибиотик должен обладать внутриклеточной фармакокинетической и фармакодинамической активностью. Антибиотик группы макролидов — азитромицин — обладает фармакокинетической способностью концентрироваться внутри макрофагов примерно в 1000 раз выше концентрации в сыворотке, вследствие чего бактерии возбудителя туляремии могут быть убиты во внутриклеточном состоянии этим антибиотиком [7].

Рифампицин также имеет фармакокинетический профиль, который включает накопление внутри эукариотических клеток и, таким образом, может оказывать антибакте-

риальное действие против внутриклеточных бактерий. Подавление рифампицином роста бактерий *F. tularensis* является бактериостатическим, но его можно использовать в сочетании с другими антибиотиками, например, с ципрофлоксацином [25].

Фенотипическая устойчивость

Различают генотипическую устойчивость, которая является наследуемой, и фенотипическую, которая не передается по наследству и заключается в изменении экспрессии генов. Фенотипическая устойчивость обеспечивается дополнительными механизмами бактериальной устойчивости, проявляемой или образованием биопленки, или включением медленной скорости роста и индукцией персистенции клеток, или индукцией экспрессии эффлюксной помпы [114].

Считается, что повышение антимикробной устойчивости может происходить из-за плохой диффузии антибиотиков через внеклеточный полисахаридный матрикс, составляющий биопленку. Неясно, какую роль биопленки играют в жизненном цикле возбудителя туляремии и болезни человека. Клетки вирулентных подвидов возбудителя туляремии значительно слабее образуют биопленки, чем свободноживущие экологические виды. Двухкомпонентная система, регулирующая производство биопленок (*qseBC*), важна для вирулентности, но считается, что биопленка больше способствует выживанию в различных экологических нишах и ее формирование, по-видимому, вызвано стрессом [15, 50, 124].

Заключение

Способность штаммов подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica* занимать различные экологические ниши и резервуары и, соответственно, менять стиль жизни (внутриклеточный, симбиотический, «некультивируемый», персистирующий, свободноживущий) объясняет его высокую экологическую стабильность и более широкое и длительное распространение в окружающей среде в сравнении с другими подвидами возбудителя туляремии.

Центральный аспект вирулентности возбудителя туляремии — это способность разрушать функцию макрофагов и нейтрофилов, предотвращать нормальный эндосомально-лизосомальный путь фагоцитоза, который является необходимым компонентом природной защиты организма человека и животного от бактериальных патогенов.

Существование особенностей строения и варьирование разнообразных модификаций форм «свободного» липида А или липида А в составе ЛПС,

а также регулирование длины ацильных цепей эндотоксина обуславливает отсутствие иммунного распознавания липида А клеток *F. tularensis*, поддержание проницаемости мембран, способности клеток возбудителя туляремии реплицироваться внутриклеточно, вызывать заболевание и сопротивляться противомикробным препаратам. Также к мультирезистентности и отбору наиболее эффективных и универсальных механизмов привело широкое распространение возбудителя туляремии *F. tularensis* subsp. *holarctica* в различных биосистемах.

Таким образом, различные бактериальные системы *F. tularensis* работают вместе, создают уникальные метаболические программы, чтобы обойти иммунную систему человека и животного, прикрепиться к эукариотическим клеткам и проникнуть в них, блокировать слияние фагосомы с лизосомой, размножиться в различных клетках хозяина, не будучи обнаруженными, ингибируя свое уничтожение, и вызвать гибель клеток-хозяев для высвобождения бактерий и инфицирования соседних клеток, приводя к развитию заболевания.

Список литературы/References

1. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Куликалова Е.С., Холин А.В., Мазепа А.В., Борзенко М.А., Пичурина Н.Л., Павлович Н.В., Носков А.К., Гранквилевский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Множественная лекарственная устойчивость клеток *F. tularensis* subsp. *holarctica*, анализ эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по туляремии на территории Российской Федерации в 2022 г. и прогноз на 2023 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2023. № 1. С. 37–47. [Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Kulikalova E.S., Kholin A.V., Mazepa A.V., Borzenko M.A., Pichurina N.L., Pavlovich N.V., Noskov A.K., Trankvilevsky D.V., Khramov M.V., Dyatlov I.A. Multidrug resistance of *F. tularensis* subsp. *holarctica*, epizootiological and epidemiological analysis of the situation on tularemia in the Russian Federation in 2022 and forecast for 2023. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2023, no. 1, pp. 37–47. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2023-1-37-47
2. Мирончук Ю.В., Мазепа А.В. Жизнеспособность и вирулентность *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* в водных экосистемах (экспериментальное изучение) // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2002. № 2. С. 9–13. [Mironchuk Yu.V., Mazepa A.V. Viability and virulence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in water ecosystems (experimental study). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2002, vol. 2, pp. 9–13. (In Russ.)]
3. Олсуфьев Н.Г., Руднев Г.П. Туляремия. М.: Медицина, 1960. 459 с. [Olsuf'ev N.G., Rudnev G.P. Tularemia. *Moscow: Meditsina*, 1960. 459 p. (In Russ.)]
4. Титов Л.П. Классификация, номенклатура и эволюция значимых для медицины бактерий // Медицинский журнал. 2006. № 1. С. 13–18. [Titov L.P. Classification, nomenclature and evolution of medically significant bacteria. *Meditsinskiy zhurnal = Medical Journal*, 2006, pp. 13–18. (In Russ.)]
5. Abd H., Johansson T., Golovliov I., Sandstrom G., Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, vol. 69, no. 1, pp. 600–606. doi: 10.1128/AEM.69.1.600-606.2003
6. Abdellahoum Z., Maurin M., Bitam I. Tularemia as a mosquito-borne disease. *Microorganisms*, 2020, vol. 9: 26. doi: 10.3390/microorganisms9010026
7. Ahmad S., Hunter L., Qin A., Mann B.J., van Hoek M.L. Azithromycin effectiveness against intracellular infections of *Francisella*. *BMC Microbiol.*, 2010, vol. 10: 123. doi: 10.1186/1471-2180-10-123
8. Alqahtani M., Ma Z., Ketkar H., Suresh R.V., Malik M., Bakshi C.S. Characterization of a unique outer membrane protein required for oxidative stress resistance and virulence of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2018, vol. 200, no. 8: e00693-17. doi: 10.1128/JB.00693-17
9. Apicella M.A., Post D.M., Fowler A.C., Jones B.D., Rasmussen J.A., Hunt J.R., Imagawa S., Choudhury B., Inzana T.J., Maier T.M., Frank D.W., Zahrt T.C., Chaloner K., Jennings M.P., McLendon M.K., Gibson B.W. Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis*. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 7: e11060. doi: 10.1371/journal.pone.0011060
10. Ariza-Miguel J., Johansson A., Fernández-Natal M.I., Martínez-Nistal C., Orduña A., Rodríguez-Ferri E.F., Hernández M., Rodríguez-Lázaro D. Molecular Investigation of tularemia outbreaks, Spain, 1997–2008. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, vol. 20, no. 5, pp. 754–761. doi: 10.3201/eid2005.130654
11. Bäckman S., Näslund J., Forsman M., Thelaus J. Transmission of tularemia from a water source by transstadial maintenance in a mosquito vector. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5: 7793. doi: 10.1038/srep07793
12. Bandara A.B., Champion A.E., Wang X., Berg G., Apicella M.A., McLendon M., Azadi P., Snyder D.S., Inzana T.J. Mutagenesis of a capsule-like complex (CLC) from *Francisella tularensis*, and contribution of the CLC to *F. tularensis* virulence in mice. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 4: e19003. doi: 10.1371/journal.pone.0019003
13. Barker J.H., Kaufman J.W., Zhang D.S., Weiss J.P. Metabolic labeling to characterize the overall composition of *Francisella* lipid A and LPS grown in broth and in human phagocytes. *Innate Immun.*, 2014, no. 20, pp. 88–103. doi: 10.1177/1753425913485308
14. Beckstrom-Sternberg S.M., Auerbach R.K., Godbole S., Pearson J.V., Beckstrom-Sternberg J.S., Deng Z., Munk C., Kubota K., Zhou Y., Bruce D., Noronha J., Scheuermann R.H., Wang A., Wei X., Wang J., J. Hao, Wagner D.M., Brettin T.S., Brown N., Gilna P., Keim P.S. Complete genomic characterization of a pathogenic A.II strain of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *PLoS One*, 2007, vol. 2, no. 9: e947. doi: 10.1371/journal.pone.0000947
15. Biot F.V., Bachert B.A., Mlynek K.D., Toothman R.G., Koroleva G.I., Lovett S.P., Klimko C.P., Palacios G.F., Cote C.K., Ladner J.T., Bozue J.A. Evolution of antibiotic resistance in surrogates of *Francisella tularensis* (LVS and *Francisella novicida*): effects on biofilm formation and fitness. *Front. Microbiol.*, 2020, vol. 11: 593542. doi: 10.3389/fmicb.2020.593542

16. Biswas S., Raoult D., Rolain J.M. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2008, no. 32, pp. 207–220. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.03.017
17. Boisset S., Caspar Y., Sutura V., Maurin M. New therapeutic approaches for treatment of tularemia: a review. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014, vol. 4: 40. doi: 10.3389/fcimb.2014.00040
18. Bradford M.K., Elkins K.L. Immune lymphocytes halt replication of *Francisella tularensis* LVS within the cytoplasm of infected macrophages. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10: 12023. doi: 10.1038/s41598-020-68798-2
19. Broman T., Thelaus J., Andersson A.C., Bäckman S., Wikström P., Larsson E., Granberg M., Karlsson L., Bäck E., Eliasson H., Mattsson R., Sjöstedt A., Forsman M. Molecular detection of persistent *Francisella tularensis* subspecies holarctica in natural waters. *Int. J. Microbiol.*, 2011: 851946. doi: 10.1155/2011/851946
20. Brunet C.D., Hennebique A., Peyroux J., Pelloux I., Caspar Y., Maurin M. Presence of *Francisella tularensis* subsp. holarctica DNA in the aquatic environment in France. *Microorganisms*, 2021, vol. 9: 1398. doi: 10.3390/microorganisms9071398
21. Brunet C.D., Peyroux J., Ponderand L., Bouillot S., Girard T., Faudry É., Maurin M., Caspar Y. Aquatic long-term persistence of *Francisella tularensis* ssp. holarctica is driven by water temperature and transition to a viable but non-culturable state. *bioRxiv*, 2022: 480867. doi: 10.1101/2022.02.18.480867
22. Caspar Y., Maurin M. *Francisella tularensis* susceptibility to antibiotics: a comprehensive review of the data obtained in vitro and in animal models. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, vol. 7: 122. doi: 10.3389/fcimb.2017.00122
23. Challacombe J.F., Pillai S., Kuske C.R. Shared features of cryptic plasmids from environmental and pathogenic *Francisella* species. *PLoS One*, 2017, vol. 12: e0183554. doi: 10.1371/journal.pone.0183554
24. Champion M.D., Zeng Q.D., Nix E.B., Nano F.E., Keim P., Kodira C.D., Borowsky M., Young S., Koehrsen M., Engels R., Pearson M., Howarth C., Larson L., White J., Alvarado L., Forsman M., Bearden S.W., Sjöstedt A., Titball R., Mitchell S.L., Birren B., Galagan J. Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 5: e1000459. doi: 10.1371/journal.ppat.1000459
25. Chen L.F., Kaye D. Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides. *Med. Clin. North Am.*, 2011, no. 95, pp. 819–842. doi: 10.1016/j.mena.2011.03.007
26. Chin C.Y., Zhao J., Llewellyn A.C., Golovliov I., Sjöstedt A., Zhou P., Weiss D.S. *Francisella* FlmX broadly affects lipopolysaccharide modification and virulence. *Cell Rep.*, 2021, vol. 35, no. 11: 109247. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109247. PMID: 34133919
27. Clemens D.L., Lee B.Y., Horwitz M.A. Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect. Immun.*, 2004, no. 72, pp. 3204–3217. doi: 10.1128/IAI.72.6.3204-3217.2004
28. Clemens D.L., Lee B.Y., Horwitz M.A. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, pp. 5892–5902. doi: 10.1128/IAI.73.9.5892-5902.2005
29. Clemens D.L., Lee B.Y., Horwitz M.A. *Francisella tularensis* phagosomal escape does not require acidification of the phagosome. *Infect. Immun.*, 2009, vol. 77, pp. 1757–1773. doi: 10.1128/IAI.01485-08
30. Clemens D.L., Lee B.Y., Horwitz M.A. O-antigen-deficient *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain mutants are ingested via an aberrant form of looping phagocytosis and show altered kinetics of intracellular trafficking in human macrophages. *Infect. Immun.*, 2012, vol. 80, pp. 952–967. doi: 10.1128/IAI.05221-11
31. Cole L.E., Yang Y., Elkins K.L., Fernandez E.T., Qureshi N., Shlomchik M.J., Herzenberg L.A., Vogel S.N. Antigen-specific B-1a antibodies induced by *Francisella tularensis* LPS provide long-term protection against *F. tularensis* LVS challenge. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, no. 11, pp. 4343–4348. doi: 10.1073/pnas.0813411106
32. Colquhoun D.J., Duodu S. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Vet. Res.*, 2011, vol. 42, no. 1: 47. doi: 10.1186/1297-9716-42-47
33. Colquhoun D.J., Larsson P., Duodu S., Forsman M. The family Francisellaceae. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds). *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014. doi: 10.1007/978-3-642-38922-1_236
34. Conlan J.W., North R.J. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect. Immun.*, 1992, vol. 60, pp. 5164–5171. doi: 10.1128/IAI.60.12.5164-5171
35. Conlan J.W., Shen H., Webb A., Perry M.B. Mice vaccinated with the O antigen of *Francisella tularensis* LVS lipopolysaccharide conjugated to bovine serum albumin develop varying degrees of protective immunity against systemic or aerosol challenge with virulent type A and type B strains of the pathogen. *Vaccine*, 2002, vol. 20, pp. 3465–3471. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00345-6
36. Conlan J.W., Chen W., Shen H., Webb A., KuoLee R. Experimental tularemia in mice challenged by aerosol or intradermally with virulent strains of *Francisella tularensis*: bacteriologic and histopathologic studies. *Microb. Pathog.*, 2003, vol. 34, no. 5, pp. 239–248. doi: 10.1016/s0882-4010(03)00046-9
37. Cowley S.C. Editorial: Proinflammatory cytokines in pneumonic tularemia: too much too late? *J. Leukoc. Biol.*, 2009, vol. 86, no. 3, pp. 469–470. doi: 10.1189/jlb.0309119
38. Cowley S.C., Elkins K.L. Immunity to *Francisella*. *Front. Microbiol.*, 2011, vol. 2: 26. doi: 10.3389/fmicb.2011.00026
39. Dai S., Rajaram M.V., Curry H.M., Leander R., Schlesinger L.S. Fine tuning inflammation at the front door: macrophage complement receptor 3 mediates phagocytosis and immune suppression for *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog.*, 2013, vol. 9: e1003114. doi: 10.1371/journal.ppat.1003114
40. DelVecchio V.G., Kapatral V., Elzer P., Patra G., Muijer C.V. The genome of *Brucella melitensis*. *Vet. Microbiol.*, 2002, vol. 90, no. 1–4, pp. 587–592. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00238-9
41. Forslund A.L., Kuoppa K., Svensson K., Salomonsson E., Johansson A., Byström M., Oyston P.C.F., Mitchell S.L., Titball R.W., Noppa L., Frithz-Lindsten E., Forsman M., Forsberg A. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol. Microbiol.*, 2006, vol. 59, no. 6, pp. 1818–1830. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05061.x
42. Forslund A.L., Salomonsson E.N., Golovliov I., Kuoppa K., Mitchell S., Titball R., Oyston P., Noppa L., Sjöstedt A., Forsberg A. The type IV pilin, PilA, is required for full virulence of *Francisella tularensis* subspecies tularensis. *BMC Microbiol.*, 2010, vol. 10: 227. doi: 10.1186/1471-2180-10-227

43. Forsman M., Henningson E.W., Larsson E., Johansson T., Sandström G. Francisella tularensis does not manifest virulence in viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, vol. 31, no. 3, pp. 217–224. doi: 10.1111/j.1574-6941.2000.tb00686.x
44. Fritz D.L., England M.J., Miller L., Waag D.M. Mouse models of aerosol-acquired tularemia caused by Francisella tularensis types A and B. *Comp. Med.*, 2014, vol. 64, no. 5, pp. 341–350.
45. Geier H., Celli J. Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of Francisella tularensis. *Infect. Immun.*, 2011, vol. 79, pp. 2204–2214. doi: 10.1128/IAI.01382-10
46. Gentry M., Taormina J., Pyles R.B., Yeager L., Kirtley M., Popov V.L., Klimpel G., Eaves-Pyles T. Role of primary human alveolar epithelial cells in host defense against Francisella tularensis infection. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, no. 8, pp. 3969–3978. doi: 10.1128/IAI.00157-07
47. Gil H., Platz G.J., Forestal C.A., Monfett M., Bakshi C.S., Sellati T.J., Furie M.B., Benach J.L., Thanassi D.G. Deletion of TolC orthologs in Francisella tularensis identifies roles in multidrug resistance and virulence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, no. 34, pp. 12897–12902. doi: 10.1073/pnas.0602582103
48. Girgis H.S., Hottes A.K., Tavazoie S. Genetic architecture of intrinsic antibiotic susceptibility. *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 5: e5629. doi: 10.1371/journal.pone.0005629
49. Golovliov I., Baranov V., Krocova Z., Kovarova H., Sjøstedt A. An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium Francisella tularensis can escape the phagosome of monocytic cells. *Infect. Immun.*, 2003, vol. 71, pp. 5940–5950. doi: 10.1128/IAI.71.10.5940-5950.2003
50. Golovliov I., Bäckman S., Granberg M., Salomonsson E., Lundmark E., Näslund J., Busch J.D., Birdsell D., Sahl J.W., Wagner D.M., Johansson A., Forsman M., Thelaus J. Long-term survival of virulent tularemia pathogens outside a host in conditions that mimic natural aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2021, vol. 87: e02713-20. doi: 10.1128/AEM.02713-20
51. Gunn J.S., Ernst R.K. The structure and function of Francisella lipopolysaccharide. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2007, no. 1105, pp. 202–218. doi: 10.1196/annals.1409.006
52. Gunnell M.K., Adams B.J., Robison R.A. The genetic diversity and evolution of Francisella tularensis with comments on detection by PCR. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2016, vol. 18, no. 1, pp. 79–91. doi: 10.21775/cimb.018.079
53. Hennebique A., Boisset S., Maurin M. Tularemia as a waterborne disease: a review. *Emerg. Microbes Infect.*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 1027–1042, doi: 10.1080/22221751.2019.1638734
54. Hopla C.E. The ecology of tularemia. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 1974, vol. 18, pp. 25–53.
55. Jackson J., McGregor A., Cooley L., Ng J., Brown M., Ong C.W., Darcy C., Sintchenko V. Francisella tularensis subspecies holarctica, Tasmania, Australia, 2011. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, vol. 18, no. 9, pp. 1484–1486. doi: 10.3201/eid1809.111856
56. Jia Q., Lee B.Y., Bowen R., Dillon B.J., Som S.M., Horwitz M.A. A Francisella tularensis live vaccine strain (LVS) mutant with a deletion in capB, encoding a putative capsular biosynthesis protein, is significantly more attenuated than LVS yet induces potent protective immunity in mice against F. tularensis challenge. *Infect. Immun.*, 2010, vol. 78, pp. 4341–4355. doi: 10.1128/IAI.00192-10
57. Jia Q., Horwitz M.A. Live attenuated tularemia vaccines for protection against respiratory challenge with virulent F. tularensis subsp. tularensis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2018, vol. 8: 154. doi: 10.3389/fcimb.2018.00154
58. Jones B.D., Faron M., Rasmussen J.A., Fletcher J.R. Uncovering the components of the Francisella tularensis virulence stealth strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014, vol. 4: 32. doi: 10.3389/fcimb.2014.00032
59. Jones C.L., Napier B.A., Sampson T.R., Llewellyn A.C., Schroeder M.R., Weiss D.S. Subversion of host recognition and defense systems by Francisella spp. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2012, vol. 76, no. 2, pp. 383–404. doi: 10.1128/MMBR.05027-11
60. Karlsson E., Golovliov I., Lärkeryd A., Granberg M., Larsson E., Öhrman C., Niemcewicz M., Birdsell D., Wagner D.M., Forsman M., Johansson A. Clonality of erythromycin resistance in Francisella tularensis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2016, vol. 71, pp. 2815–2823. doi: 10.1093/jac/dkw235
61. Kassinger S.J., van Hoek M.L. Genetic determinants of antibiotic resistance in Francisella. *Front. Microbiol.*, 2021, vol. 12: 644855. doi: 10.3389/fmicb.2021.644855
62. Kingry L.C., Petersen J.M. Comparative review of Francisella tularensis and Francisella novicida. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014, vol. 4: 35. doi: 10.3389/fcimb.2014.00035
63. Kopping E.J., Doyle C.R., Sampath V., Thanassi D.G. Contributions of TolC orthologs to Francisella tularensis Schu S4 multidrug resistance, modulation of host cell responses, and virulence. *Infect. Immun.*, 2019, vol. 87: e00823-18. doi: 10.1128/IAI.00823-18
64. Kubelkova K., Macela A. Francisella and antibodies. *Microorganisms*, 2021, vol. 9, no. 10: 2136. doi: 10.3390/microorganisms9102136
65. Kubelkova K., Hudcovic T., Kozakova H., Pejchal J., Macela A. Early infection-induced natural antibody response. *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11, no. 1: 1541. doi: 10.1038/s41598-021-81083-0
66. Kugeler K.J., Mead P.S., Janusz A.M., Staples J.E., Kubota K.A., Chalcraft L.G., Petersen J.M. Molecular epidemiology of Francisella tularensis in the United States. *Clin. Infect. Dis.*, 2009, vol. 48, no. 7, pp. 863–870. doi: 10.1086/597261
67. Kumar R., Bröms J.E., Sjøstedt A. Exploring the diversity within the genus Francisella — an integrated pan-genome and genome-mining approach. *Front. Microbiol.*, 2020, vol. 11: 1928. doi: 10.3389/fmicb.2020.01928
68. Lai X.H., Shirley R.L., Crosa L., Kanistanon D., Tempel R., Ernst R.K., Gallagher L.A., Manoil C., Heffron F. Mutations of Francisella novicida that alter the mechanism of its phagocytosis by murine macrophages. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 7: e11857. doi: 10.1371/journal.pone.0011857
69. Larsson P., Elfsmark D., Svensson K., Wikström P., Forsman M., Brettin T., Keim P., Johansson A. Molecular evolutionary consequences of niche restriction in Francisella tularensis, a facultative intracellular pathogen. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 6: e1000472. doi: 10.1371/journal.ppat.1000472
70. Lewisch E., Menanteau-Ledouble S., Tichy A., El-Matbouli M. Susceptibility of common carp and sunfish to a strain of Francisella noatunensis subsp. orientalis in a challenge experiment. *Dis. Aquat. Organ.*, 2016, vol. 121, no. 2, pp. 161–166. doi: 10.3354/dao03044
71. Li Y., Powell D.A., Shaffer S.A., Rasko D.A., Pelletier M.R., Leszyk J.D., Scott A.J., Masoudi A., Goodlett D.R., Wang X., Raetz C.R.H., Ernst R.K. LPS remodeling is an evolved survival strategy for bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109, no. 22, pp. 8716–8721. doi: 10.1073/pnas.1202908109

72. Lindemann S.R., McLendon M.K., Apicella M.A., Jones B.D. An in vitro model system used to study adherence and invasion of *Francisella tularensis* live vaccines training nonphagocytic cells. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, pp. 3178–3182. doi: 10.1128/IAI.01811-06
73. Lundstrom J.O., Andersson A.C., Backman S., Schafer M.L., Forsman M., Thelaus J. Transstadial transmission of *Francisella tularensis* holarctica in mosquitoes, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, vol. 17, no. 5, pp. 794–799. doi: 10.3201/eid1705.100426
74. Ma Z., Banik S., Rane H., Mora V.T., Rabadi S.M., Doyle C.R., Thanassi D.G., Bakshi C.S., Malik M. EmrA1 membrane fusion protein of *Francisella tularensis* LVS is required for resistance to oxidative stress, intramacrophage survival and virulence in mice. *Mol. Microbiol.*, 2014, vol. 91, no. 5, pp. 976–995. doi: 10.1111/mmi.12509
75. Mahawar M., Atianand M.K., Dotson R.J., Mora V., Rabadi S.M., Metzger D.W., Huntley J.F., Harton J.A., Malik M., Bakshi C.S. Identification of a novel *Francisella tularensis* factor required for intramacrophage survival and subversion of innate immune response. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 30, pp. 25216–25229. doi: 10.1074/jbc.M112.367672
76. Martin-Garcia J.M., Hansen D.T., Zook J., Loskutov A.V., Robida M.D., Craciunescu F.M., Sykes K.F., Wachter R.M., Fromme P., Allen J.P. Purification and biophysical characterization of the CapA membrane protein FTT0807 from *Francisella tularensis*. *Biochemistry*, 2014, vol. 53, no. 12, pp. 1958–1970. doi: 10.1021/bi401644s
77. Martinez J.L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov. Today Technol.*, 2014, vol. 11, pp. 33–39. doi: 10.1016/j.ddtec.2014.02.001
78. McCaffrey R.L., Allen L.A. *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, vol. 80, pp. 1224–1230. doi: 10.1189/jlb.0406287
79. Melillo A., Sledjeski D.D., Lipski S., Wooten R.M., Basur V., Lafontaine E.R. Identification of a *Francisella tularensis* LVS outer membrane protein that confers adherence to A549 human lung cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2006, vol. 263, pp. 102–108. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00413.x
80. Michell S.L., Dean R.E., Eyles J.E., Hartley M.G., Waters E., Prior J.L., Titball R.W., Oyston P.C.F. Deletion of the *Bacillus anthracis* capB homologue in *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* generates an attenuated strain that protects mice against virulent tularaemia. *J. Med. Microbiol.*, 2010, vol. 59, pp. 1275–1284. doi: 10.1099/jmm.0.018911-0
81. Moreland J.G., Hook J.S., Bailey G., Ulland T., Nauseef W.M. *Francisella tularensis* directly interacts with the endothelium and recruits neutrophils with a blunted inflammatory phenotype. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2009, vol. 296, no. 6, pp. L1076–L1084. doi: 10.1152/ajplung.90332.2008
82. Mörner T. The ecology of tularaemia. *Rev. Sci. Tech.*, 1992, vol. 11, no. 4, pp. 1123–1130.
83. Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C., Klose K.E., Cheung K.K., Roberts M.J., Ludu J.S., Letendre G.W., Meierovics A.I., Stephens G., Elkins K.L. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, no. 19, pp. 6430–6436. doi: 10.1128/JB.186.19.6430-6436.2004
84. Nano F.E., Schermer C. The *Francisella* pathogenicity island. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2007, vol. 1105, pp. 122–137. doi: 10.1196/annals.1409.000
85. Öhrman C., Sahl J.W., Sjödin A., Uneklikt I., Ballard R., Karlsson L., McDonough R.F., Sundell D., Soria K., Bäckman S., Chase K., Brindefalk B., Sozhamannan S., Vallesi A., Hägglund E., Ramirez-Paredes J.G., Thelaus J., Colquhoun D., Myrtenäs K., Birdsell D., Johansson A., Wagner D.M., Forsman M. Reorganized genomic taxonomy of Francisellaceae enables design of robust environmental PCR assays for detection of *Francisella tularensis*. *Microorganisms*, 2021, vol. 9, no. 1: 146. doi: 10.3390/microorganisms9010146
86. Okan N.A., Kasper D.L. The atypical lipopolysaccharide of *Francisella*. *Carbohydr. Res.*, 2013, vol. 378, pp. 79–83. doi: 10.1016/j.carres.2013.06.015
87. Ozanic M., Marecic V., Kwaik Y.A., Santic M. The divergent intracellular lifestyle of *Francisella tularensis* in evolutionarily distinct host cells. *PLoS Pathog.*, 2015, vol. 11, no. 12: e1005208. doi: 10.1371/journal.ppat.1005208
88. Parkhill J., Wren B.W., Thomson N.R., Titball R.W., Holden M.T., Prentice M.B., Sebahia M., James K.D., Churcher C., Mungall K.L., Baker S., Basham D., Bentley S.D., Brooks K., Cerdeño-Tarraga A.M., Chillingworth T., Cronin A., Davies R.M., Davis P., Dougan G., Feltwell T., Hamlin N., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Leather S., Moule S., Oyston P.C., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., Barrell B.G. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*, 2001, vol. 413, no. 6855, pp. 523–527. doi: 10.1038/35097083
89. Parra M.C., Shaffer S.A., Hajjar A.M., Gallis B.M., Hager A., Goodlett D.R., Guina T., Miller S., Collins C.M. Identification, cloning, expression, and purification of *Francisella lpp3*: an immunogenic lipoprotein. *Microbiol. Res.*, 2010, vol. 165, no. 7, pp. 531–545. doi: 10.1016/j.micres.2009.11.004
90. Perez-Castrillon J.L., Bachiller-Luque P., Martin-Luquero M., Mena-Martin F.J., Herreros V. Tularaemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, vol. 33, pp. 573–576. doi: 10.1086/322601
91. Petrosino J.F., Xiang Q., Karpathy S.E., Jiang H.Y., Yerrapragada S., Liu Y.M., Gioia J., Hemphill L., Gonzalez A., Raghavan T.M., Uzman A., Fox G.E., Highlander S., Reichard M., Morton R.J., Clinkenbeard K.D., Weinstock G.M. Chromosome rearrangement and diversification of *Francisella tularensis* revealed by the type B (OSU18) genome sequence. *J. Bacteriol.*, 2006, vol. 188, no. 19, pp. 6977–6985. doi: 10.1128/JB.00506-06
92. Phillips N.J., Schilling B., McLendon M.K., Apicella M.A., Gibson B.W. Novel modification of lipid A of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, pp. 5340–5348. doi: 10.1128/IAI.72.9.5340-5348.2004
93. Pilo P. Phylogenetic lineages of *Francisella tularensis* in animals. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2018, vol. 8: 258. doi: 10.3389/fcimb.2018.00258
94. Qin A., Mann B.J. Identification of transposon insertion mutants of *Francisella tularensis* strain SchuS4 deficient in intracellular replication in the hepatic cell line HepG2. *BMC Microbiol.*, 2006, vol. 6: 69. doi: 10.1186/1471-2180-6-69
95. Qin A., Scott D.W., Rabideau M.M., Moore E.A., Mann B.J. Requirement of the CXXC motif of novel *Francisella* infectivity potentiator protein B FipB, and FipA in virulence of *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *PLoS One*, 2011, vol. 6: e24611. doi: 10.1371/journal.pone.0024611
96. Qin A., Scott D.W., Thompson J.A., Mann B.J. Identification of an essential *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* virulence factor. *Infect. Immun.*, 2009, vol. 77, pp. 152–161. doi: 10.1128/IAI.01113-08

97. Qin A., Zhang Y., Clark M.E., Rabideau M.M., MillanBarea L.R., Mann B.J. FipB, an essential virulence factor of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, has dual roles in disulfide bond formation. *J. Bacteriol.*, 2014, vol. 196, no. 20, pp. 3571–3581. doi: 10.1128/JB.01359-13
98. Raetz C.R., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 2002, vol. 71, pp. 635–700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414
99. Raetz C.R., Guan Z., Ingram B.O., Six D.A., Song F., Wang X., Zhao J. Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *J. Lipid Res.*, 2009, vol. 50 (suppl.), pp. S103–S108. doi: 10.1194/jlr.R800060-JLR200
100. Ramakrishnan G., Sen B., Johnson R. Paralogous outer membrane proteins mediate uptake of different forms of iron and synergistically govern virulence in *Francisella tularensis tularensis*. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 30, pp. 25191–25202. doi: 10.1074/jbc.M112.371856
101. Ramakrishnan G., Sen B. The FupA/B protein uniquely facilitates transport of ferrous iron and siderophore-associated ferric iron across the outer membrane of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbiology*, 2014, vol. 160, pp. 446–457. doi: 10.1099/mic.0.072835-0
102. Ravel J., Jiang L., Stanley S.T., Wilson M.R., Decker R.S., Read T.D., Worsham P., Keim P.S., Salzberg S.L., Fraser-Liggett C.M., Rasko D.A. The complete genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames “Ancestor”. *J. Bacteriol.*, 2009, vol. 191, no. 1, pp. 445–446. doi: 10.1128/JB.01347-08
103. Rohmer L., Fong C., Abmayr S., Wasnick M., Freeman T.J.L., Radey M., Guina T., Svensson K., Hayden H.S., Jacobs M., Gallagher L.A., Manoil C., Ernst R.K., Drees B., Buckley D., Haugen E., Bovee D., Zhou Y., Chang J., Levy R., Lim R., Gillett W., Guentherer D., Kang A., Shaffer S.A., Taylor G., Chen J., Gallis B., D’Argenio D.A., Forsman M., Olson M.V., Goodlett D.R., Kaul R., Miller S.I., Brittner M.J. Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains. *Genome Biol.*, 2007, vol. 8, no. 6: R102. doi: 10.1186/gb-2007-8-6-r102
104. Rowe H.M., Huntley J.F. From the outside-in: the *Francisella tularensis* envelope and virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2015, vol. 5: 94. doi: 10.3389/fcimb.2015.00094
105. Santic M., Ozanic M., Semic V., Pavokovic G., Mrvcic V., Kwaik Y.A. Intra-vacuolar proliferation of *F. novicida* within *H. vermiciformis*. *Front. Microbiol.*, 2011, vol. 2: 78. doi: 10.3389/fmicb.2011.00078
106. Schmidt M., Klimentova J., Rehulka P., Straskova A., Spidlova P., Szotakova B., Stulik J., Pavkova I. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* DsbA homologue: a thioredoxin-like protein with chaperone function. *Microbiology*, 2013, vol. 159, pp. 2364–2374. doi: 10.1099/mic.0.070516-0
107. Schmitt D.M., Barnes R., Rogerson T., Haught A., Mazzella L.K., Ford M., Gilson T., Birch J.W.-M., Sjöstedt A., Reed D.S., Franks J.M., Stolz D.B., Denvir J., Fan J., Rekulapally S., Primerano D.A., Horzempa J. The role and mechanism of erythrocyte invasion by *Francisella tularensis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, vol. 7: 173. doi: 10.3389/fcimb.2017.00173
108. Schulert G.S., Allen L.A. Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, vol. 80, pp. 563–571. doi: 10.1189/jlb.0306219
109. Sen B., Meeker A., Ramakrishnan G. The *ftsI* homolog, FTL_0439 (*fupA/B*), mediates siderophore-dependent iron uptake in *Francisella tularensis* LVS. *Infect. Immun.*, 2010, vol. 78, no. 10, pp. 4276–4285. doi: 10.1128/IAI.00503-10
110. Shibata K., Shimizu T., Nakahara M., Ito E., Legoux F., Fujii S., Yamada Y., Furutani-Seiki M., Lantz O., Yamasaki S., Watarai M., Shirai M. The intracellular pathogen *Francisella tularensis* escapes from adaptive immunity by metabolic adaptation. *Life Sci. Alliance*, 2022, vol. 5, no. 10: e202201441. doi: 10.26508/lsa.202201441
111. Sjödin A., Svensson K., Öhrman C., Ahlinder J., Lindgren P., Duodu S., Johansson A., Colquhoun D.J., Larsson P., Forsman M. Genome characterisation of the genus *Francisella* reveals insight into similar evolutionary paths in pathogens of mammals and fish. *BMC Genomics*, 2012, vol. 13: 268. doi: 10.1186/1471-2164-13-268
112. Sjöstedt A.B. *Francisella*. In: *The Proteobacteria, Part B, Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, 2005, Vol. 2, 2nd ed. Eds.: D.J. Brenner, J.T. Staley, G.M. Garrity. *New York: Springer*, pp. 200–210.
113. Sjöstedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2007, vol. 1105, pp. 1–29. doi: 10.1196/annals.1409.009
114. Soto S.M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 2013, vol. 4, no. 3, pp. 223–229. doi: 10.4161/viru.23724
115. Su J., Yang J., Zhao D., Kawula T.H., Banas J.A., Zhang J.R. Genome-wide identification of *Francisella tularensis* virulence determinants. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, no. 6, pp. 3089–3101. doi: 10.1128/IAI.01865-06
116. Sutera V., Hoarau G., Renesto P., Caspar Y., Maurin M. In vitro and in vivo evaluation of fluoroquinolone resistance associated with DNA gyrase mutations in *Francisella tularensis*, including in tularemia patients with treatment failure. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2017, vol. 50, no. 3, pp. 377–383. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.022
117. Sutera V., Levert M., Burmeister W.P., Schneider D., Maurin M. Evolution toward high-level fluoroquinolone resistance in *Francisella* species. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014, vol. 69, no. 1, pp. 101–110. doi: 10.1093/jac/dkt321
118. Svensson K., Bäck E., Eliasson H., Berglund L., Granberg M., Karlsson L., Larsson P., Forsman M., Johansson A. Landscape epidemiology of tularemia outbreaks in Sweden. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, vol. 15, no. 12, pp. 1937–1947. doi: 10.3201/eid1512.090487
119. Thakran S., Li H., Lavine C.L., Miller M.A., Bina J.E., Bina X.R., Re F. Identification of *Francisella tularensis* lipoproteins that stimulate the toll-like receptor (TLR)2/TLR1 heterodimer. *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, no. 7, pp. 3751–3760. doi: 10.1074/jbc.M706854200
120. Thelaus J., Andersson A., Broman T., Bäckman S., Granberg M., Karlsson L., Kuoppa K., Larsson E., Lundmark E., Lundström J.O., Mathisen P., Näslund J., Schäfer M., Wahab T., Forsman M. *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* occurs in Swedish mosquitoes, persists through the developmental stages of laboratory-infected mosquitoes and is transmissible during blood feeding. *Microb. Ecol.*, 2014, vol. 67, pp. 96–107. doi: 10.1007/s00248-013-0285-1
121. Thelaus J., Andersson A., Mathisen P., Forslund A., Noppa L., Forsman M. Influence of nutrient status and grazing pressure on the fate of *Francisella tularensis* in lake water. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2009, vol. 67, no. 1, pp. 69–80. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00612.x

122. Travis B.A., Ramsey K.M., Prezioso S.M., Tallo T., Wandzilak J.M., Hsu A., Borgnia M., Bartesaghi A., Dove S.L., Brennan R.G., Schumacher M.A. Structural basis for virulence activation of *Francisella tularensis*. *Mol. Cell*, 2021, vol. 81, no. 1, pp. 139–152. e10. doi: 10.1016/j.molcel.2020.10.035
123. Trent M.S. Biosynthesis, transport, and modification of lipid A. *Biochem. Cell. Biol.*, 2004, vol. 82, no. 1, pp. 71–86. doi: 10.1139/o03-070
124. Van Hoek M.L. Biofilms: an advancement in our understanding of *Francisella* species. *Virulence*, 2013, vol. 4, pp. 833–846. doi: 10.4161/viru.27023
125. Vinogradov E., Conlan W.J., Gunn J.S., Perry M.B. Characterization of the lipopolysaccharide O-antigen of *Francisella novicida* (U112). *Carbohydr. Res.*, 2004, vol. 339, no. 3, pp. 649–654. doi: 10.1016/j.carres.2003.12.013
126. Vinogradov E., Perry M.B. Characterization of the core part of the lipopolysaccharide O-antigen of *Francisella novicida* (U112). *Carbohydr. Res.*, 2004, vol. 339, no. 9, pp. 1643–1648. doi: 10.1016/j.carres.2004.04.013
127. Vinogradov E., Perry M.B., Conlan J.W. Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, 2002, vol. 269, pp. 6112–6118. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03321.x
128. Vogler A.J., Birdsall D., Price L.B., Bowers J.R., Beckstrom-Sternberg S.M., Auerbach R.K., Beckstrom-Sternberg J., Johansson A., Clare A., Buchhagen J.L., Petersen J.M., Pearson T., Vaissaire J., Dempsey M.P., Foxall P., Engelthaler D.M., Wagner D.M., Keim P. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.*, 2009, vol. 191, no. 8, pp. 2474–2484. doi: 10.1128/JB.01786-08
129. Wang X., Ribeiro A.A., Guan Z., McGrath S.C., Cotter R.J., Raetz C.R. Structure and biosynthesis of free lipid A molecules that replace lipopolysaccharide in *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, no. 48, pp. 14427–14440. doi: 10.1021/bi061767s
130. Wang Q., Shi X., Leymarie N., Madico G., Sharon J., Costello C.E., Zaia J. A typical preparation of *Francisella tularensis* O-antigen yields a mixture of three types of saccharides. *Biochemistry*, 2011, vol. 50, no. 50, pp. 10941–10950. doi: 10.1021/bi201450v
131. Williamson D.R., Dewan K.K., Patel T., Wastella C.M., Ning G., Kirimanjeswara G.S. A single mechanosensitive channel protects *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* from hypoosmotic shock and promotes survival in the aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2018, vol. 84, no. 5: e02203-17. doi: 10.1128/AEM.02203-17
132. Zellner B., Huntley J.F. Ticks and Tularemia: do we know what we don't know? *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2019, vol. 9: 146. doi: 10.3389/fcimb.2019.00146

Авторы:

Кудрявцева Т.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;

Мокриевич А.Н., д.м.н., зав. отделом особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия.

Authors:

Kudryavtseva T.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Mokrievich A.N., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.01.2024
Принята к печати 08.03.2024

Received 26.01.2024
Accepted 08.03.2024

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ТРАНСПОРТА ВИРУСНОГО МАТЕРИАЛА SARS-CoV-2 В НЕЙРОНАХ НЕОКОРТЕКСА СИРИЙСКИХ ХОМЯКОВ

С.В. Чепур¹, Н.М. Парамонова^{1,2}, И.А. Мясникова¹, Н.Н. Плужников¹, М.А. Тюнин¹,
Б.А. Каневский¹, Н.С. Ильинский¹

¹ ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Введение. С учетом опыта пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19 в настоящее время значительно возросла актуальность исследований клеточных процессов сборки и транспорта вируса SARS-CoV-2 для обоснования выбора точек фармакологического воздействия. Прослеженная широкая распространенность вируса SARS-CoV-2 в организме и его способность проникать через гематоэнцефалический барьер, определяет возможность морфологической оценки процессов его жизненного цикла в нейронах неокортекса с использованием метода электронной микроскопии, что и стало целью настоящей работы. **Материалы и методы.** Вирус SARS-CoV-2 получали от больных, накапливали на культуре клеток Vero(B). Электронномикроскопическое исследование (ЭМИ) транспорта вирусных частиц проводили на самцах сирийских хомяков. Животным интраназально вводили по 26 мкл культуры вируса в количестве 4×10^4 ТЦД₅₀/мл. Эвтаназия животных проводилась на 3, 7 и 28 сутки после заражения. Извлеченный мозг подготавливали для ЭМИ согласно ранее описанным в литературе методикам. Результаты регистрировали с помощью электронного микроскопа FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN. **Результаты.** При ЭМИ прослежены морфологические эквиваленты вариантов транспорта вируса в нейронах неокортекса в динамике инфекционного процесса у сирийских хомяков. После синтеза белки вирусной мембраны включаются в транспортные везикулы в терминальных канальцах эндоплазматического ретикулума (ЭР) и поступают в промежуточный компартмент (ПК) — совокупность гладкостенных мембранных везикул между эндоплазматическим ретикулумом (ЭР) и аппаратом Гольджи (АГ). В первые 3-е суток после заражения вирусные копии включаются в АГ в транспортных везикулах, сформированных мембранами ПК. Из-за больших размеров вирусные частицы ограничены расширенными концами подвижных цистерн АГ. Морфологически выявлена деструкция мембран АГ на 7-е сутки инфекционного процесса, что свидетельствует о взаимодействии везикул ПК с сохранившимися мембранными элементами АГ или о реализации их самостоятельной транспортной функции по доставке вируса к периферии клетки и далее в межклеточное пространство. В отростках нейронов прослежен транспорт зрелых вирусных частиц, ассоциированных с элементами цитоскелета, что не выявляли в других локусах персистенции вируса. **Заключение.** По результатам полученных данных можно сформировать представление о накопительном значении для прогрессии и пер-

Адрес для переписки:

Мясникова Ирина Анатольевна
195043, Россия, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, 4,
Государственный научноисследовательский испытательный
институт военной медицины МО РФ.
Тел.: 8 (921) 788-41-75.
E-mail: ropsha.home@rambler.ru

Contacts:

Irina A. Myasnikova
195043, Russian Federation, St. Petersburg, Lesoparkovaya str., 4,
State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine
of Defense Ministry of the Russian Federation.
Phone: +7 (921) 788-41-75.
E-mail: ropsha.home@rambler.ru

Для цитирования:

Чепур С.В., Парамонова Н.М., Мясникова И.А., Плужников Н.Н.,
Тюнин М.А., Каневский Б.А., Ильинский Н.С. Исследование
особенностей транспорта вирусного материала SARS-CoV-2
в нейронах неокортекса сирийских хомяков // Инфекция и иммунитет.
2024. Т. 14, № 1. С. 24–34. doi: 10.15789/2220-7619-ISV-16270

Citation:

Chepur S.V., Paramonova N.M., Myasnikova I.A., Pluzhnikov N.N.,
Tyunin M.A., Kanevsky B.A., Ilyinsky N.S. Investigating SARS-CoV-2 virion
material trafficking in syrian hamster neocortical neurons // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1,
pp. 24–34. doi: 10.15789/2220-7619-ISV-16270

систирования SARS-CoV-2-инфекции в кортикальных нейронах. Ранние признаки заражения нейрона представлены характерными изменениями ядер, гипертрофией ЭР и формированием «вирусных фабрик» на основе ЭР, ПК и АГ. Внутри нейрона происходит формирование вирусной биомассы, выход вириона из клетки в большей степени сопровождается ее гибелью, нежели при включении вируса в лизосомно-эндосомную систему.

Ключевые слова: коронавирус, аппарат Гольджи, промежуточный компартмент, эндосомно-лизосомная система, эндоплазматический ретикулум, нейроны.

INVESTIGATING SARS-CoV-2 VIRION MATERIAL TRAFFICKING IN SYRIAN HAMSTER NEOCORTECAL NEURONS

Chepur S.V.^a, Paramonova N.M.^{a,b}, Myasnikova I.A.^a, Pluzhnikov N.N.^a, Tyunin M.A.^a, Kanevsky B.A.^a, Ilyinsky N.S.^a

^a State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

^b Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Introduction. Taking into account the experience on the new coronavirus infection COVID-19 pandemic, the relevance of studies assessing the cellular processes of SARS-CoV-2 virus assembly and transport to justify the choice of pharmacological action points has now markedly increased. The study was aimed at analyzing morphologically assessed events of SARS-CoV-2 life cycle in neocortical neurons using electron microscopy based on its traced wide prevalence in vivo and ability to penetrate the blood-brain barrier accounts. **Materials and methods.** Patient-derived SARS-CoV-2 virus was obtained and accumulated in Vero(B) cell culture. An electron microscopy study (EMR) of the viral particle transport was carried out in male Syrian hamsters. Animals were inoculated intranasally with 26 µl of virus culture in an amount of 4×10^4 TCID₅₀/ml. Animals were euthanized on day 3, 7, and 28 post-infection. The extracted brain was prepared for EMR according to methods previously described in the literature. The results were recorded using an FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN electron microscope. **Results.** Using EMR, the morphological equivalents of virus transport variants in neocortical neurons were traced dynamically during infectious process in Syrian hamsters. After synthesis, viral membrane proteins are included in transport vesicles in the endoplasmic reticulum (ER) terminal tubules and enter the intermediate compartment (IC), a collection of smooth-walled membrane vesicles between the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus (AG). In the first 3 days post-infection, viral copies are included in the Ag in PC membrane-formed transport vesicles. Due to the large size, viral particles are restricted to the expanded ends of the mobile AG tanks. Morphologically, destruction of AG membranes was revealed on day 7 post-infection, which indicates an interaction between PC vesicles and preserved AG membrane elements or the implementation of their independent transport function to deliver SARS-CoV-2 virus to the cell periphery and further into the intercellular space. In the neuronal processes, the transport of mature SARS-CoV-2 viral particles associated with cytoskeletal elements was observed, which was not detected in other loci of virus persistence. **Conclusion.** Based on data obtained, it is possible to hypothesize about a cumulative importance for progression and persistence of SARS-CoV-2 infection in cortical neurons. Early signs of neuron infection are represented by characteristic changes in the nuclei, ER hypertrophy and formation of “viral factories” based on the ER, PC and AG. The formation of viral biomass occurs inside neurons; virion exit from target cells is more accompanied by cell death rather than if a virus becomes incorporated in the lysosomal-endosomal system.

Key words: coronavirus, Golgi apparatus, intermediate compartment, endosome-lysosome's system, endoplasmic reticulum, neuron.

Введение

Пандемическая сущность SARS-CoV-2 в значительной степени определила акценты исследования биологии вируса, сместив их в плоскость профилактики и терапии заболевания, разработку мер по прерыванию эпидемического процесса. Вместе с тем вирус SARS-CoV-2 кроме патологической сущности представляет инструмент для исследования функций клеточных органелл и транспортных систем клетки. Это подтверждает широкая распространенность вируса в организме, и его доказанная способность проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), вызывая повреждения нейронов [4].

Большинство вновь образованных вирусных частиц в нервных клетках движется по кон-

ститутивному секреторному пути через аппарат Гольджи (АГ) к плазматической мембране. Вместе с тем необратимые изменения структуры цистерн АГ определяют необходимость изучения путей секреции, альтернативных конститутивному. Некоторые вирусы проникают в просвет эндоплазматического ретикулума (ЭР), везикулы промежуточного компартмента (ПК) или остаются в АГ [17].

Считают, что сборка коронавирусов возможна в везикулах ПК [20], в большей степени в его везикулярно-трубчатых скоплениях — совокупности небольших везикул и канальцев, локализованных между ЭР и АГ [10]. В них происходит декорирование вирусных белков посредством О-гликозилирования, в частности N-ацетилгалактозамином [22]. В везикулах

ПК присутствуют и другие ферментные системы, в частности р58/ERGIC-53 [12] и ГТФазы Rab1 и Rab2 [13, 17]. Коронавирусы, использующие ПК для сборки вирионов, принадлежат к разным родам (α -, β -и γ -CoV) [12]. Это свойство описано и для возбудителей тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) и ближневосточного респираторного синдрома (MERS) [19].

Плеоморфные вирионы коронавируса имеют значительную размерную гетерогенность, от 100 до 160 нм в диаметре [17]. Одноцепочечная вирусная РНК комплексируется с несколькими копиями N-белка, после чего рибонуклеопротеин сворачивается, образуя спиральный нуклеокапсид [11]. S-белок представляет собой большой тримерный гликопротеин. Белок подвергается значительной терминальной модификации ферментами АГ с N-декорированием различными гликанами [9, 15]. М-белок считают основным белковым компонентом вирусной оболочки, придающим вириону его форму [5]. Он по-разному модифицируется N- или O-связанными сахарами. E-белки оболочки представлены небольшими однопрофильными интегральными мембранными протеинами, которые обычно модифицированы пальмитилированием. Они присутствуют в небольших количествах в вирусных частицах, но играют существенную роль в сборке вирионов [18], образуя пентамерический ионный канал (виropорин), необходимый для высвобождения вирусов. Учитывая компартиментализацию сборки коронавируса в везикулярно-трубчатых скоплениях ПК, именно E-белок обеспечивает полостное изменение pH [25] с саккулярным расширением везикул, необходимым для накопления вирусных частиц [23].

Саккулярные домены ПК, где происходит сборка вирионов, могут обособляться для переноса крупногабаритных вирусных частиц в центральную область АГ или в мегавезикулы [24], посредством которых возможен транспорт вируса по периферии пластинчатого комплекса, а также в элементы самостоятельных секреторных путей в обход АГ [8] при разрушении его цистерн. Элементы ПК, определяемые по соответствующей ферментативной активности, прослежены в перицентросомальной области и на периферии клетки [16], и они были пространственно связаны с рециркулируемыми эндосомами. Таким образом, при разрушении АГ высвобождение вирионов не зависит от классического секреторного пути и может происходить через эндосомно-лизосомную систему [6].

Сформированные теоретические представления важны для выбора точек фармакологического воздействия на узловы моменты вирусной

продукции и анализа морфологических наблюдений различной локализации вирусных частиц в нейронах неокортекса сирийских хомяков.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование проводили на 24 самцах сирийских хомяков в возрасте 4–6 недель массой тела 80–100 г, полученных из питомника ЗАО «НПО «Дом фармации» (Санкт-Петербург). Животных содержали в стандартных условиях вивария.

Выделение и накопление изолятов вируса. Образцы носоглоточных смывов, полученные от больных COVID-19, осветляли центрифугированием, фильтровали через шприцевую насадку Jet Biofil с диаметром пор 0,22 мкм (Biofil, Китай) и высевали на монослой культуры клеток Vero(B), выращенных в культуральных флаконах площадью поверхности 25 см². Инкубацию инфицированных культур клеток проводили при температуре 37°C в течение 5 суток или до появления цитопатического действия (ЦПД) вирусов, согласно ранее описанным в литературе методикам [21, 26]. Наличие вируса в культуральной жидкости подтверждали, используя набор реагентов Detection Kit For 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) RNA (PCR-Fluorescence Probing) (DAAN GENE LTD, Sun Yat-Sen University, Китай). На этой же клеточной линии определяли тканевую цитопатическую дозу вируса (ТЦД₅₀/мл) по методу Рида и Менча [14].

Для инфицирования животных использовали штамм hCoV-19/StPetersburg-SC-2-05/2022. Штамм был выделен сотрудниками ФГБУ ГНИИИ ВМ МО РФ в 2022 г. на территории Санкт-Петербурга от пациента больного COVID-19. Данный штамм депонирован в коллекцию вирусов ФГБУ ГНИИИ ВМ МО РФ.

Были сформированы контрольная и опытные группы животных. Массу животных регистрировали до заражения и ежедневно в течение последующих 28 суток. Перед заражением животных наркотизировали раствором «Золетил 100» в дозе 40 мг/кг внутривенно. Далее механическим дозатором интраназально каждому хомяку опытной группы вводили по 26 мкл культуры вируса, содержащей SARS-CoV-2 в количестве 4×10^4 ТЦД₅₀/мл [2]. Эвтаназию животных на 3, 7 или 28 сутки после заражения проводили передозировкой общего анестетика (растворы «Ксила» 20 мг/мл и «Золетил 100» 50 мг/мл, соотношение 1:1) в объеме 1 мл на 1 кг массы тела внутримышечно.

Выделение РНК вируса из образцов головного мозга сирийских хомяков. Ткань головного мозга гомогенизировали (FastPrep-24 5G, MP Biomedicals), в десятикратном объеме стериль-

ного PBS и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученную надосадочную жидкость использовали для выделения РНК. Выделение РНК из 10% суспензии образцов тканей головного мозга сирийских хомячков, проводили с помощью коммерческого набора «AllPrepDNA/RNA/miRNAUniversalKit» (Qiagen, Германия). Все этапы экстракции РНК выполняли согласно инструкции производителя.

Для определения вируса SARS-CoV-2 в тканях головного мозга зараженных животных использовали набор реагентов Detection Kit For 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) RNA (PCR-Fluorescence Probing) (DAAN GENE LTD, Sun Yat-Sen University, Китай).

Для электронно-микроскопических исследований (ЭМИ) извлеченный мозг рассекали на фронтальные срезы толщиной в 1–1,5 мм и префиксировали в охлажденной до 4°C смеси 4% параформальдегида и 0,5% глутарового альдегида, приготовленной на 0,1 М какодилатном буфере (рН 7,2–7,4). Выделенные кусоч-

ки сенсомоторного отдела неокортекса через 1,5–2 ч дофиксировали 1% раствором четырехоксида осмия (все реактивы — Sigma-Aldrich, Германия). Обезвоживали материал в растворах этилового спирта восходящей концентрации и абсолютного ацетона. В процессе дегидратации контрастировали ткань в кусочках 3,5% уранилацетатом на 70° этаноле. Пропитку и заливку с ориентацией кусочков под лупой проводили смесью аралдитов (Fluka, Швейцария). Полимеризацию осуществляли в термостате при 37°C и 60°C в течение трех суток [1].

Ультратонкие срезы 50–60 нм готовили на ультратоме LKB-III (LKB, Швеция). Регистрацию изменений структуры тканей осуществляли на электронном микроскопе FEI Tecnai G2 Spirtit BioTWIN (FEI Company, Нидерланды) при ускоряющем напряжении 80 кВ, предоставленном ЦКП ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН.

Сравнение проводили с аналогичными характеристиками животных группы виварного контроля.

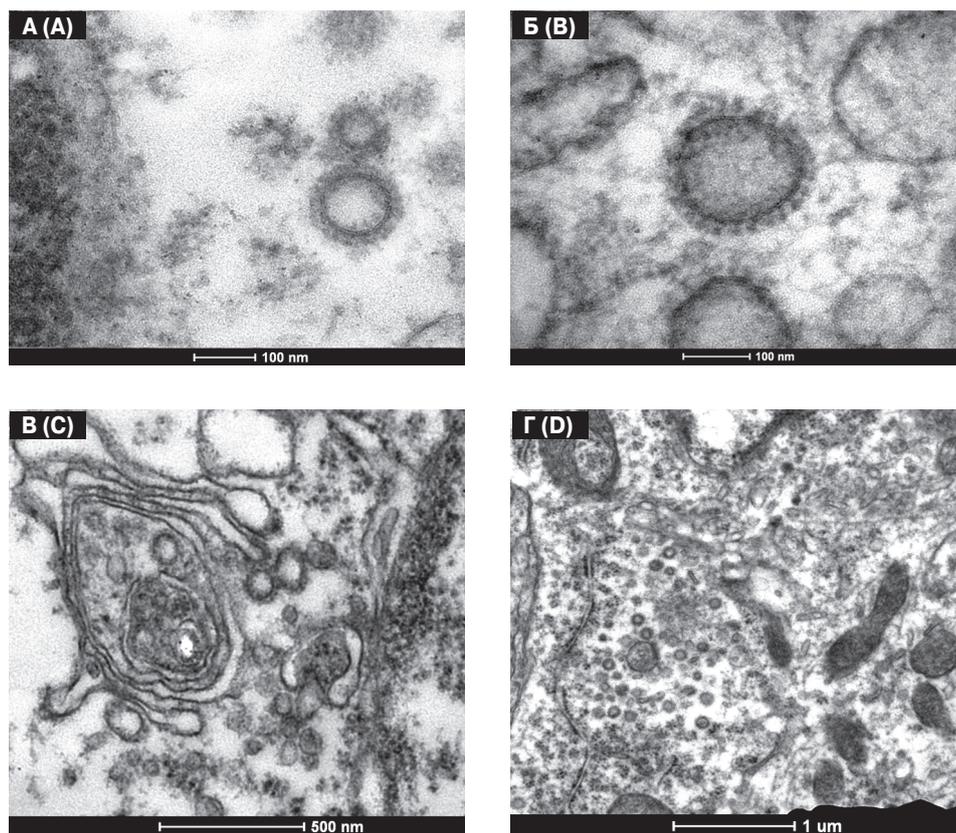


Рисунок 1. Свободные соразмерные коронавирусу (80–100 нм) опушенные белками везикулы в отростках (А, Б) и в перикарионах (В–Г) нейронов, часто вблизи измененных полостей ЭР или АГ, после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). Электроннограммы. Увеличение: А — 105 000, Б — 135 000, В — 43 000, Г — 16 500

Figure 1. Free SARS-CoV-2-sized (80–100 nm) protein-pubescent vesicles in the processes (A, B) and neuronal perikarya (C–D), often near altered cavities of the ER or AG, after infection with SARS-CoV-2 4×10^4 TCD₅₀/ml (26 μ l/individual intranasally). Electronograms. Scale: A — 105 000, B — 135 000, C — 43 000, D — 16 500

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines For Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Комитетом по этике биомедицинских исследований организации (Протокол № 21 от 23.11.2020).

Результаты

Бесспорно, самым противоречивым аспектом существующих теорий пролиферации SARS-CoV-2 в нейронах стало наличие в цитозоле перикариона и даже в отростках соразмерных вирусу везикул, заметно превышающих размеры клатриновых пузырьков (рис. 1). Свободные вирусоподобные везикулы выявлены в цитоплазме тел и отростков нейронов в ассоциации с элементами цитоскелета: нейрофиламентами и микротрубочками, ответственны-

ми за направление внутриклеточного транспорта, активное движение отростков, кинетику формы нейрона.

При анализе пути и способа проникновения вирусов в нейроны обращали внимание на процессы пиноцитоза. В этом случае вирусные частицы окружены мембранной оболочкой пиноцитозных везикул, на поверхности которых также отмечали преципитацию белка, однако более крупно-глыбчатую по сравнению со структурой вирусной «короны» (рис. 2).

Фигуры пиноцитоза, прослеженные в одном и том же волокне на протяжении, позволяют считать, что посредством пиноцитоза/экзоцитоза вирусы могут проходить транзитом через отросток, не вызывая изменений его структуры. Это утверждение справедливо и для ГЭБ (рис. 2В).

С точки зрения репликации вируса заражение нейрона SARS-CoV-2 приводит к характерным изменениям структуры ядра, суть которых

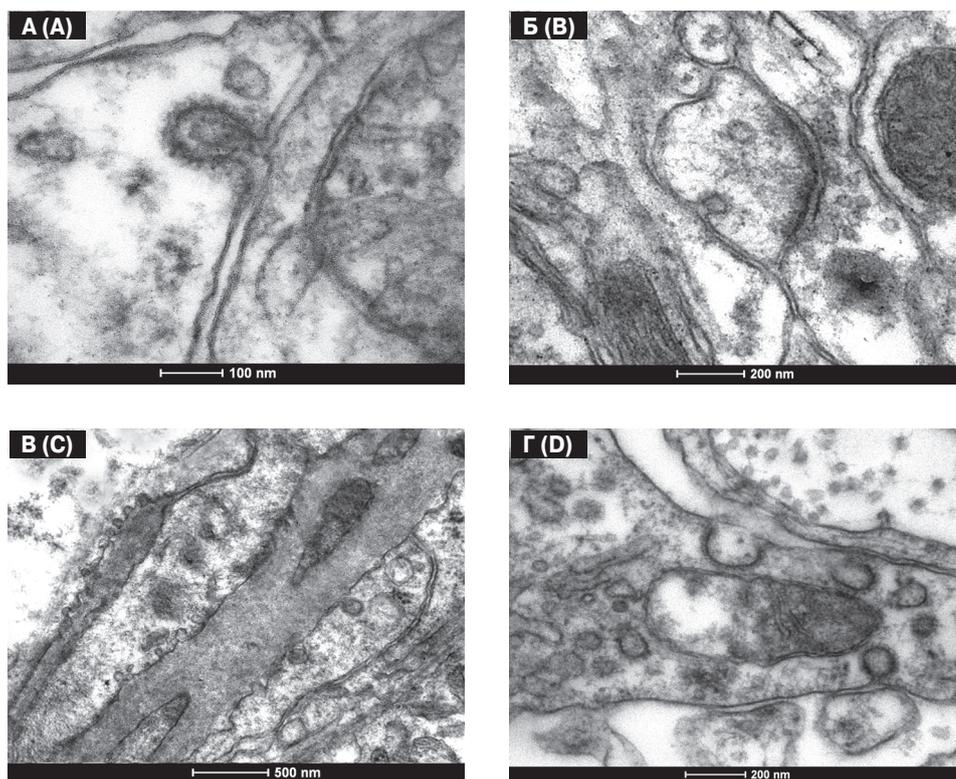


Рисунок 2. Варианты пиноцитоза соразмерных вирусам «опушенных» частиц в нейропиле неокортекса после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). Формирование декорированных белком пиноцитозных везикул (А–Б), содержащих окруженный мембраной материал межклеточного пространства. Неспецифические процессы пиноцитоза и экзоцитоза в том числе вирусного материала структур сосудистых стенок (В) и поверхностных клеток мозга (Г). Электроннограммы. Увеличение: А – 105 000, Б – 60 000, В – 26 500, Г – 60 000

Figure 2. Pinocytosis variants for “pubescent” particles commensurate with viruses in neocortical neuropil after infection with SARS-CoV-2 4×10^4 TCD₅₀/ml (26 μ l/individual intranasally). Formation of protein-decorated pinocytotic vesicles (A–B), containing membrane-surrounded material of the intercellular space. Nonspecific processes of pinocytosis and exocytosis, including viral material of the structures of vascular walls (C) and cortical surface cells (D). Electronograms. Scale: A – 105 000, B – 60 000, C – 26 500, D – 60 000

сводится к увеличению удельной поверхности и накоплению рибонуклеопротеинов, формирующих множественные ядрышки (рис. 3). Начиная с 3 суток после заражения животных культурой клеток с накопленной вирусной массой, практически в каждом ядре прослеживали ядрышковый аппарат, поверхность нуклеолемы резко увеличивалась вследствие чего округлое в норме ядро нейрона приобретало лопастную форму со множеством узураций расширенного перинуклеарного пространства (рис. 3Б). Структура карио- и цитоплазмы в значительной степени была сохранена, что позволяло относить изменения ядер к реактивным, но сопряженным с процессом пролиферации вируса изменениям.

Вследствие насыщения рибосомами поверхность мембран ЭР приобретала подчеркнутую контрастность, неравномерно расширенные каналцы прослеживали на значительном протяжении, начиная с соустья с перинуклеар-

ным пространством (рис. 3Г). «Ампульные» расширения каналцев ЭР с преципитацией белка на их цитоплазматической поверхности по сути иллюстрируют отпочкование вирусных частиц определенной зрелости (рис. 4). Нарботанные компоненты вирусного генома поступают из ядра в каналцы шероховатого ЭР по коммуникациям, связывающим их с перинуклеарным пространством. Определяется нерегулярное слипание мембран расширенных участков ЭР и заполнение формирующихся везикул слабоконтрастным гомогенным содержимым (рис. 4А). Прослежено отшнуровывание «опушенных» везикул, соразмерных вирионам, на границах таких мембранных конгломератов и локализация свободных вирусных частиц вокруг них (рис. 4Б), то есть формирование вирусных «фабрик» на основе структурных и функциональных изменений ЭР.

Рассматривая варианты морфологических проявлений вирусной прогрессии, обращали

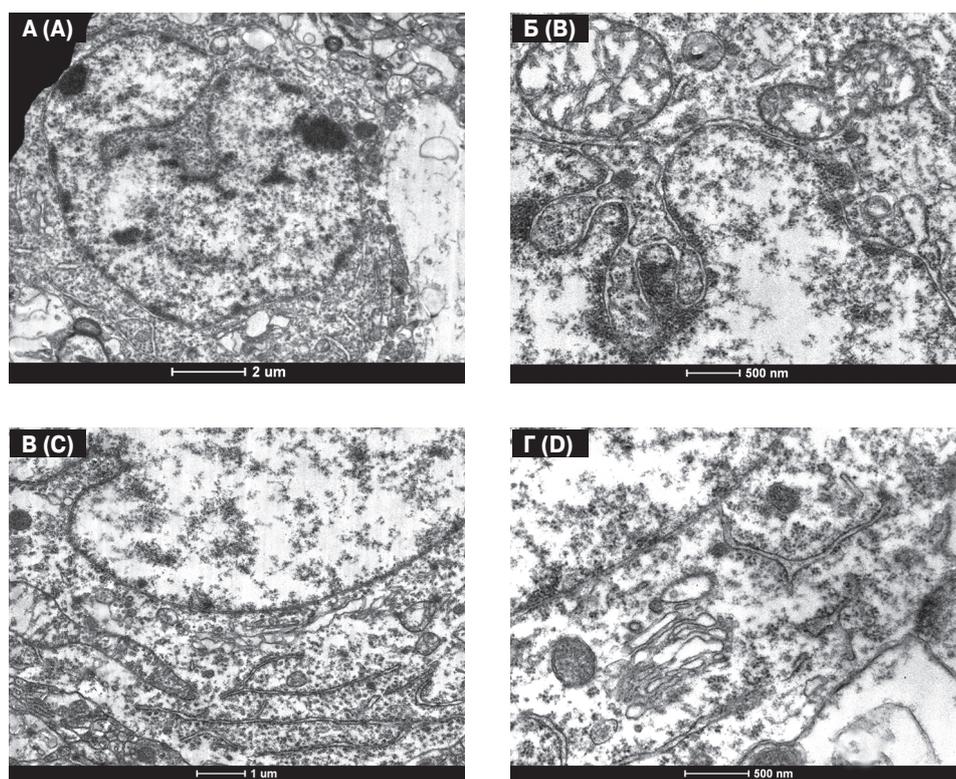


Рисунок 3. Ультраструктура нейронов после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). В кариоплазме нейронов прослежены многочисленные ядрышки, локализующиеся примембранно; контур ядер часто изменен с округлого на лопастной (А–В) с расширением перинуклеарного пространства (Б) и скоплением рибосом в прилежащей к ядру цитолемме (А–В). Канальцы ЭР нередко соединены с ядерной мембраной, цистерны АГ набухшие и слипаются (Г). Электроннограммы. Увеличение: А – 6000, Б – 20 500, В – 9900, Г – 26 500

Figure 3. Neuronal ultrastructure after infection with SARS-CoV-2 4×10^4 TCD₅₀/ml (26 µl/individual, intranasally inoculated). In neuronal karyoplasm, numerous nucleoli were traced, localized near the membrane; nuclear contour is often changed from round to lobed (A–C) with expanded perinuclear space (B) and accumulated ribosomes in the cytolemma adjacent to the nucleus (A–C). ER tubules are often connected to the nuclear membrane, AG cisterns are swollen and stick together (D). Electronograms. Scale: A – 6000, B – 20 500, C – 9900, D – 26 500

внимание на характерные изменения АГ во всех клеточных элементах неокортекса сирийских хомячков, прежде всего в нейронах (рис. 5). Число комплексов и площадь, занимаемая ими, в профиле нейронального среза вследствие их гиперплазии возрастали с течением инфекционного процесса. Если к 3 суткам после заражения в каждом 3–4 нейроне обнаруживали разрастание АГ и пролиферацию вируса, то к 7 суткам это явление носило тотальный характер. Практически в каждом сохранившемся нейроне на фоне гипертрофии цитоплазматических органелл преобладали измененные комплексы АГ. Нередко отдельные их элементы распространялись глубоко в отростки нервных клеток.

Деформации в большей степени подвержены пластинчатые цистерны АГ. Они нерегулярно расширялись в размерах, демонстрируя

пропульсивную активность, характерная цис-/транс-полярность АГ нивелировалась (рис. 5А, Б, В). Значительное количество краевых цистерн увеличено в размерах. Прослеживали слипание мембран пластинчатого комплекса и заполнение его матрикса гомогенным содержанием, которое с учетом вирус-пролиферативной активности измененных АГ, по-видимому, представляет собой вирусные белки (рис. 5Г, Д, Е). Регистрировали отшнурование от модифицированных АГ везикул, соразмерных вирусным частицам, декорированных осмиофильными белками (рис. 5А–Е). Несмотря на варианты функционирования АГ при формировании вирусосодержащих везикул [17], следует признать, что к 7 суткам после инфицирования практически во всех зараженных нейронах АГ утрачивает пластинчатую структуру и функционирует

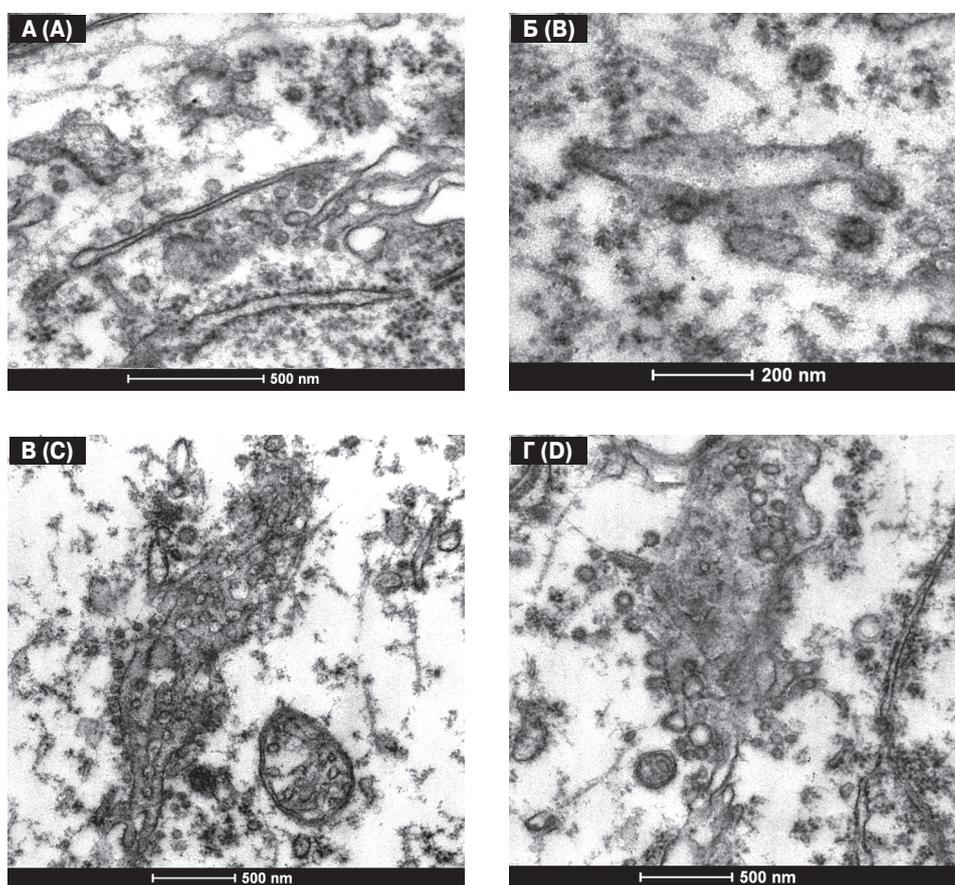


Рисунок 4. Формирование вирусных «фабрик» на основании деформационных изменений структур ЭР после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). Расширение концевых участков тонких канальцев ЭР (А), с «опушением» вирусным белком на «ампульных» расширениях (Б). Гипертрофия и слипание расширенных канальцев ЭР (В). Слияние мембран ЭР с образованием вирусных «фабрик» и отпочкованием вирусных частиц (Г). Электроннограммы. Увеличение: А — 43 000, Б — 60 000, В и Г — 26 500

Figure 4. Formation of viral “factories” based on deformation changes in ER structures after infection with SARS-CoV-2 4×10^4 TCD₅₀/ml (26 μ l/individual intranasally). Expansion of the terminal sections of the ER thin tubules (A), with “pubescence” of the viral protein on the “ampullary” extensions (B). Hypertrophy and adhesion of dilated ER tubules (C). Fusion of ER membranes resulting in viral “factories” and viral particle budding (D). Electronograms. Scale: A — 43 000, B — 60 000, C and D — 26 500

как «вирусная фабрика». Причем в состав вириона включаются не только синтезированные вирусные белки, претерпевающие посттрансляционные модификации, но и экстрадированные фосфолипидные фрагменты мембран АГ, а также ЭР и ПК. Мембраны в измененном гиперадгезивном состоянии, по-видимому, служат матрицей для интегрирования белков вирусной частицы, обеспечивая за счет поверхностно-активных свойств их размер и коронавидное гликозилирование S-белка. Вирусные частицы, формируемые модифицированными АГ и ЭР, отшнуровываются в цитозоль, в связи с чем можно считать, что свободные формы вирусных частиц представляют вариант репродукции вируса с его накоплением в цитоплазме перикариона и отростков нервных клеток. Выход вирусов, соответственно, может произойти при гибели клетки по мере накопления критических патологических изменений.

Интеграция в вирион компонентов клеточных мембран нервных клеток может способствовать формированию аутоиммунных конфликтов, свойственных клинике лонг-ковид.

Отдельный интерес представляли мультивезикулярные тельца (МВТ), так как эта форма мембранных структур была ранее описана применительно к внутриклеточному транспорту вирусных частиц [27]. Собственно, внимание привлекали не все МВТ, а только те, которые содержали соразмерные вирусам «опушенные» везикулы (рис. 6). Прослеженные МВТ могли представлять собой мультивезикулярную глобулу как транспортную форму, сформированную либо мембраной АГ, ЭР или ПК, либо фрагментом цистерн АГ или ПК, а также, с гораздо меньшей вероятностью, являться продуктом эндоцитоза. Следует отметить, что в нейронах неокортекса МВТ были сравнительно редкими, выявлялись в перикарионе и в иници-

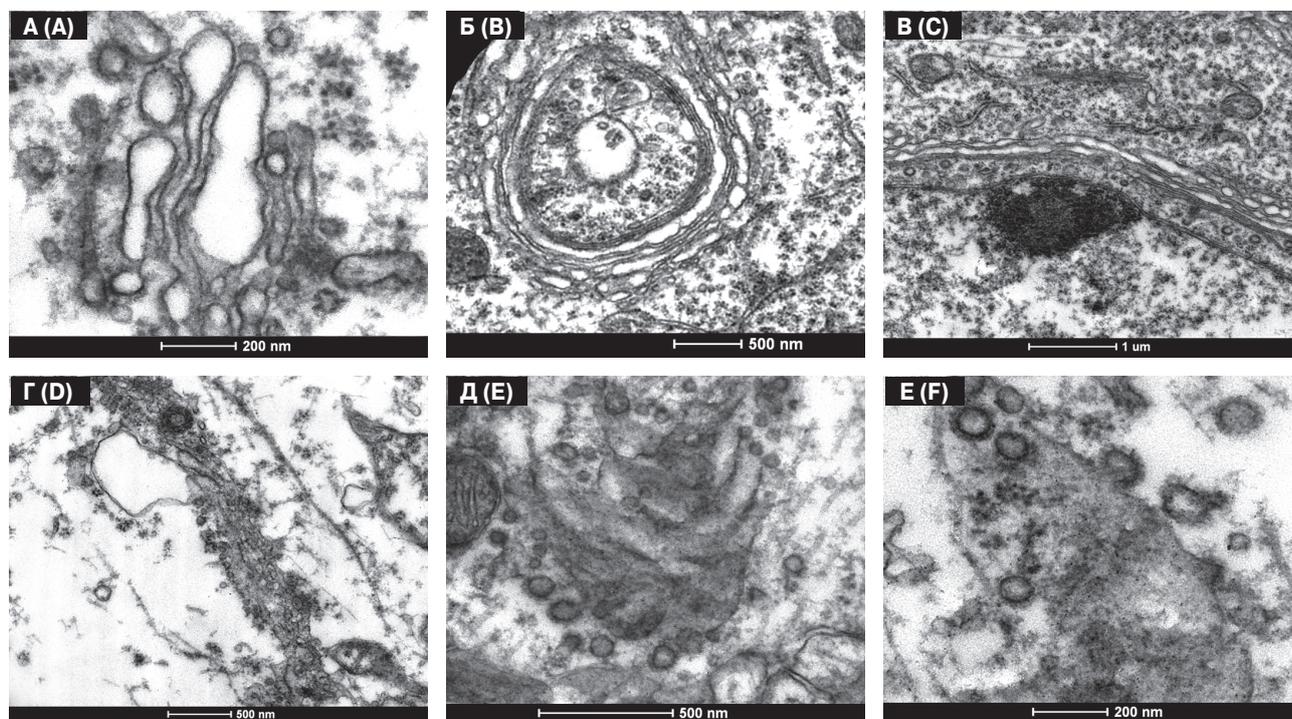


Рисунок 5. Изменения АГ после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). Неравномерное набухание цистерн АГ (А), кольцеобразный АГ с потерей цис-/транс-полярности (Б); гипертрофия АГ в перикарионной области нейрона (В); модифицированный АГ простирается внутри дендрита на отдаленном расстоянии от сомы (Г); слипание разбухших цистерн АГ (Б), образовавшийся конгломерат вирусной фабрики (Е) тотальная пролиферация соразмерных вирусу CoV «опушенных» везикул на основе реорганизаций пластинчатого комплекса (А–Е). Электроннограммы. Увеличение: А – 60 000, Б – 20 500, В – 16 500, Г – 26 500, Д – 43 000, Е – 60 000

Figure 5. Changes in AG after infection with SARS-CoV-2 4×10^4 TCD₅₀/ml (26 μ l/individual intranasally). Uneven swelling of AG cisterns (A), ring-shaped AG with loss of cis/trans polarity (B); AG hypertrophy in neuronal perikarya (C); modified AG extends inside the dendrite distantly from the soma (D); adhesion of swollen AG tanks (B), the resulting conglomerate of the viral factory (F) total proliferation of “pubescent” vesicles commensurate with the CoV virus based on lamellar complex reorganizations (A–F). Electronograms. Scale: A – 60 000, B – 20 500, C – 16 500, D – 26 500, E – 43 000, F – 60 000

альных отростках клеток. Количество везикул, идентифицированных как вирусные частицы, в них заметно уступало свободным формам, отшнурованным от АГ или ЭР.

Обсуждение

Соразмерные вирусу везикулы в отростках и в телах нейронов расценены нами как вирусные частицы в силу отсутствия таковых у незараженных животных. Они располагались свободно, что вызвало ряд требующих уточнения вопросов. Почему вирусная частица в цитозоле нервной клетки не связывается с клеточными мишенями и может существовать в свободном, не компартментализированном мембраной состоянии? Что представляют собой выявленные частицы: элемент фазы заражения или стадию диссеминации вновь произведенных вирусных частиц? Каким образом происходит выход неограниченной мембраной вирусной частицы

через клеточную мембрану? Ответы на эти вопросы составили предмет проведенного морфологического анализа.

На самом деле, свободные вирусоподобные везикулы в цитозоле всегда связаны с элементами цитоскелета, детерминирующими направления их транспорта. Учитывая, что нейротубулы и нейрофиламенты определяют кинетику формы нейронов и их отростков посредством сборки/разборки полимерных структур, а также актин-миозиновых процессов контрактильности, можно предположить возможность вируса проявлять аффинитет к динамично открывающимся сайтам связывания и участвовать в данных процессах.

Ангиотензиновая система мозга, как одна из медиаторных систем, широко распространена в корковых и подкорковых структурах. Соответственно, ангиотензинпревращающий фермент, являющийся мишенью SARS-CoV-2, иммуногистохимически выявлен как на по-

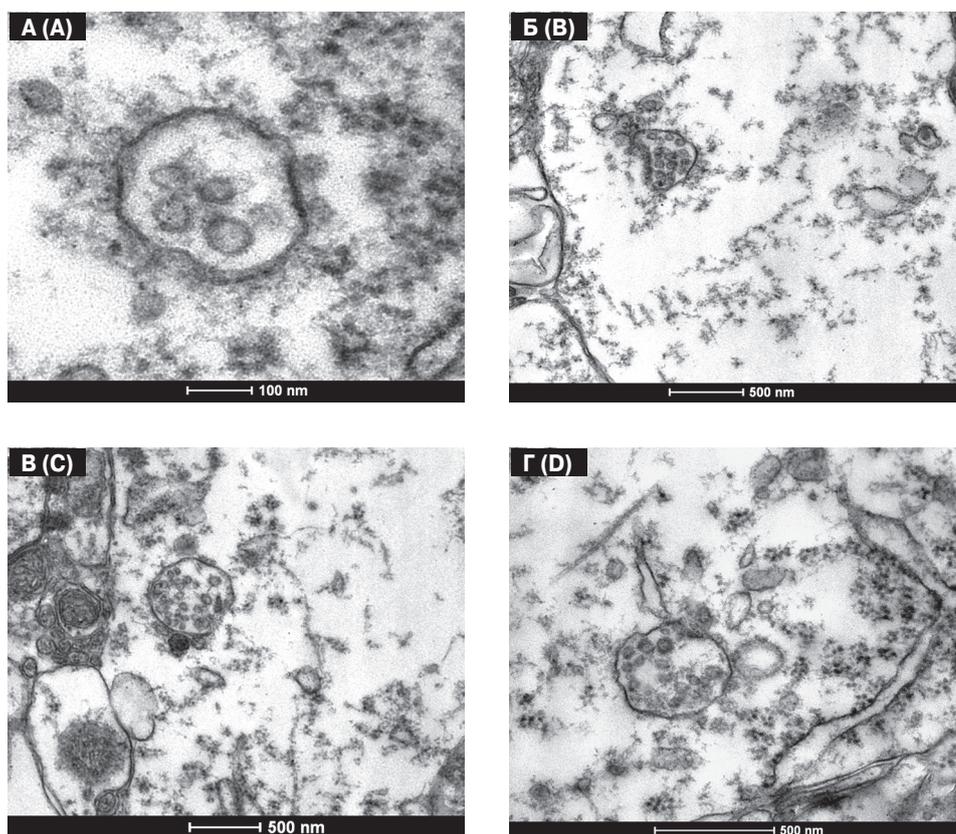


Рисунок 6. Мультивезикулярные тельца в нейронах неокортекса после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). Комплексы мультивезикулярных телец с элементами цитоскелета (А, Г), их представительство в составе измененного АГ (Б) и в участках цитозоля с повышенной белоксинтетической активностью (В). Электроннограммы. Увеличение: А — 105 000, Б — 26 500, В — 20 500, Г — 43 000

Figure 6. Multivesicular bodies in neocortical neurons after infection with SARS-CoV-2 4×10^4 TCD₅₀/ml (26 μ l/individual intranasally). Complexes of multivesicular bodies with cytoskeletal elements (A, D), their representation within altered AG (B) and in cytosolic areas with enhanced protein synthetic activity (C). Electronograms. Scale: A — 105 000, B — 26 500, C — 20 500, D — 43 000

верхности, так и внутри нервных клеток, в том числе на мембране митохондрий и кариолемме [4]. Вместе с тем исследование процессов пиноцитоза в нейропиле белого вещества комиссуральных волокон позволило предположить, что проникновение вируса в клетку однозначно не означает ее поражение.

Применительно к кортикальным нейронам можно сформировать представление об их накопительном значении для прогрессии и персистенции SARS-CoV-2-инфекции в организме. К ранним признакам заражения нейрона вирусом следует отнести характерные изменения ядер,

свидетельствующие о высокой пластической активности, гипертрофию ЭР и формирование вирусных фабрик на основе ЭР, ПК и АГ, мембраны которых расходуются на формирование вирусных частиц, обеспечивая интеграцию синтезированных вирусных белков. Применительно к клеткам нервной системы нельзя судить о высокой активности АГ- или ПК-ассоциированных транспортных систем. Формирование вирусной биомассы происходит внутри нейрона, а выход вириона из клетки в большей степени происходит при ее гибели, чем при включении вируса в лизосомно-эндосомную систему.

Список литературы/References

1. Гайер Г. Электронная гистохимия. М.: Мир, 1974. 488 с. [Geyer G. Electronic histochemistry. Moscow: Mir, 1974. 488 p. (In Russ.)]
2. Макаренко И.Е., Авдеева О.И., Ванатиев Г.В., Рыбакова А.В., Ходько С.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Возможные пути и объемы введения лекарственных средств лабораторным животным // Международный вестник ветеринарии. 2013. № 3. С. 72–78. [Makarenko I.E., Avdeeva O.I., Vanati G.V., Rybakova A.V., Khodko S.V., Makarova M.N., Makarov V.G. Possible ways of administration and standard drugs in laboratory animals. *Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii = International Bulletin of Veterinary Medicine*, 2013, no. 3, pp. 72–78. (In Russ.)]
3. Матвеев Ю.А. Система ангиотензина II коры мозжечка и ее значение в нейрососудистой регуляции // Вестник новых медицинских технологий. 2020. № 1. С. 90–95. [Matveev Yu.A. Angiotensin II system in cerebellum cortex and its role in neuro-vascular regulation. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii = Journal of New Medical Technologies*, 2020, no. 1, pp. 90–95. (In Russ.)] doi: 10.24411/2075-4094-2020-16498
4. Чепур С.В., Тюнин М.А., Мясников В.А., Алексеева И.И., Владимировна О.О., Ильинский Н.С., Никишин А.С., Шевченко В.А., Смирнова А.В. Поражение органов и тканей SARS-CoV-2: биологическая модель на сирийских хомьяках *Mesocricetus auratus* для экспериментальных (доклинических) исследований // Клиническая и экспериментальная морфология. 2021. Т. 10, № 4. С. 25–34. [Chepur S.V., Tyunin M.A., Myasnikov V.A., Alekseeva I.I., Vladimirova O.O., Iljinskiy N.S., Nikishin A.S., Shevchenko V.A., Smirnova A.V. Damage to organs and tissues of SARS-CoV-2: a biological model on Syrian hamsters for experimental (preclinical) studies. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya = Clinical and Experimental Morphology*, 2021, vol. 10, no. 4, pp. 25–34. (In Russ.)] doi: 10.31088/CEM2021.10.4.25-34
5. Fehr A.R., Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.*, 2015, vol. 1282, pp. 1–23. doi: 10.1007/978-1-4939-2438-7_1
6. Ghosh S., Dellibovi-Ragheb T.A., Kerviel A., Pak E., Qiu Q., Fisher M., Takvorian P.M., Bleck C., Hsu V.W., Fehr A.R., Perlman S., Achar S.R., Straus M.R., Whittaker G.R., de Haan C.A.M., Kehrl J., Altan-Bonnet G., Altan-Bonnet N. β -coronavirus use lysosomes for egress instead of the biosynthetic secretory pathway. *Cell*, 2020, vol. 183, no. 6, pp. 1520–1535. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.039
7. Griffiths G., Ericsson M., Krijnse-Locker J., Nilsson T., Goud B., Söling H.D., Tang B.L., Wong S.H., Hong W. Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J. Cell. Biol.*, 1994, vol. 127, no. 6, pt. 1, pp. 1557–1574. doi: 10.1083/jcb.127.6.1557
8. Hanus C., Geptin H., Tushev G., Garg S., Alvarez-Castelao B., Sambandan S., Kochen L., Hafner A.S., Langer J.D., Schuman E.M. Unconventional secretory processing diversifies neuronal ion channel properties. *Elife*, 2016, vol. 5. doi: 10.7554/eLife.20609
9. Hartenian E., Nandakumar D., Lari A., Ly M., Tucker J.M., Glaunsinger B.A. The molecular virology of coronaviruses. *J. Biol. Chem.*, 2020, vol. 295, no. 37, pp. 12910–12934. doi: 10.1074/jbc.REV120.013930
10. Horstmann H., Ng C.P., Tang B.L., Hong W. Ultrastructural characterization of endoplasmic reticulum-Golgi transport containers (EGTC). *J. Cell. Sci.*, 2002, vol. 115, no. 22, pp. 4263–4273. doi: 10.1242/jcs.00115
11. Klein S., Cortese M., Winter S.L., Wachsmuth-Melm M., Neufeldt C.J., Cerikan B., Stanifer M.L., Boulant S., Bartenschlager R., Chlanda P. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat. Commun.*, 2020, vol. 11, no. 5885. doi: 10.1038/s41467-020-19619-7
12. Klumperman J., Locker J.K., Meijer A., Horzinek M.C., Geuze H.J., Rottier P.J. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J. Virol.*, 1994, vol. 68, no. 10, pp. 6523–6534. doi: 10.1128/jvi.68.10.6523-6534.1994
13. Plutner H., Cox A.D., Pind S., Khosravi-Far R., Bourne J.R., Schwaninger R., Der C.J., Balch W.E. Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments. *J. Cell. Biol.*, 1991, vol. 115, no. 1, pp. 31–43. doi: 10.1083/jcb.115.1.31
14. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Epidemiol.*, 1938, vol. 27, no. 3, pp. 493–497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
15. Ritchie G., Harvey D.J., Feldmann F., Stroehrer U., Feldmann H., Royle L., Dwek R.A., Rudd P.M. Identification of N-linked carbohydrates from severe acute respiratory syndrome (SARS) spike glycoprotein. *Virology*, 2010, vol. 399, no. 2, pp. 257–269. doi: 10.1016/j.virol.2009.12.020

16. Sannerud R., Marie M., Nizak C., Dale H.A., Pernet-Gallay K., Perez F., Goud B., Saraste J. Rab1 defines a novel pathway connecting the pre-Golgi intermediate compartment with the cell periphery. *Mol. Biol. Cell*, 2006, vol. 17, no. 4, pp. 1514–1526. doi: 10.1091/mbc.E05-08-0792
17. Saraste J., Prydz K. Assembly and cellular exit of Coronaviruses: hijacking an unconventional secretory pathway from the pre-golgi intermediate compartment via the Golgi ribbon to the extracellular space. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 3: 503. doi: 10.3390/cells10030503
18. Schoeman D., Fielding B.C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Viol. J.*, 2019, vol. 16, no. 1: 69. doi: 10.1186/s12985-019-1182-0
19. Stertz S., Reichelt M., Spiegel M., Kuri T., Martinez-Sobrido L., Garcia-Sastre A., Weber F., Kochs G. The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology*, 2007, vol. 361, no. 2, pp. 304–315. doi: 10.1016/j.virol.2006.11.027
20. Sturman L.S., Holmes K.V. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.*, 1983, vol. 28, pp. 35–112. doi: 10.1016/S0065-3527(08)60721-6
21. Taştan C., Yurtsever B., Sir Karakuş G., Dilek Kançaği D., Demir S., Abanuz S., Seyis U., Yildirim M., Kuzay R., Elibol Ö., Arbak S., Açikel E., Birdoğan S., Sezerman U.O., Kocagöz A.S., Yalçın K., Ovali E. SARS-CoV-2 isolation and propagation from Turkish COVID-19 patients. *Turk. J. Biol.*, 2020, vol. 44, no. 3, pp. 192–202. doi: 10.3906/biy-2004-113
22. Tooze S.A., Tooze J., Warren G. Site of addition of N-acetyl-galactosamine to the E1 glycoprotein of mouse hepatitis virus-A59. *J. Cell. Biol.*, 1988, vol. 106, no. 5, pp. 1475–1487. doi: 10.1083/jcb.106.5.1475
23. Ulasli M., Verheije M.H., de Haan C.A., Reggiori F. Qualitative and quantitative ultrastructural analysis of the membrane rearrangements induced by coronavirus. *Cell. Microbiol.*, 2010, vol. 12, no. 6, pp. 844–861. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01437.x
24. Volchuk A., Amherdt M., Ravazzola M., Brugger B., Rivera V.M., Clackson T., Perrelet A., Söllner T., Rothman J.E., Orci L. Megavesicles implicated in the rapid transport of intracisternal aggregates across the Golgi stack. *Cell*, 2000, vol. 102, no. 3, pp. 335–348. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00039-8
25. Westerbeck J.W., Machamer C.E. The infectious bronchitis coronavirus envelope protein alters Golgi pH to protect the spike protein and promote the release of infectious virus. *J. Virol.*, 2019, vol. 93, no. 11: e00015-19. doi: 10.1128/JVI.00015-19
26. Yao P., Zhang Y., Sun Y., Gu Y., Xu F., Su B., Chen C., Lu H., Wang D., Yang Z., Niu B., Chen J., Xie L., Chen L., Zhang Y., Wang H., Zhao Y., Guo Y., Ruan J., Zhu Z., Fu Z., Tian D., An Q., Jiang J., Zhu H. Isolation and growth characteristics of SARS-CoV-2 in Vero cell. *Viol. Sin.*, 2020, vol. 35, no. 3, pp. 348–350. doi: 10.1007/s12250-020-00241-2

Авторы:

Чепур С.В., д.м.н., профессор, начальник ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Парамонова Н.М., старший научный сотрудник ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия; научный сотрудник ФГУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Мясникова И.А., к.б.н., старший научный сотрудник научно-исследовательского испытательного центра ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Плужников Н.Н., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Тюнин М.А., к.м.н., зам. начальника научно-исследовательского испытательного центра ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Каневский Б.А., зам. начальника научно-исследовательского отдела ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Ильинский Н.С., зам. начальника научно-исследовательского отдела ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Chepur S.V., DSc (Medicine), Professor, Head of State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;

Paramonova N.M., Senior Researcher, State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation; Researcher, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation;

Myasnikova I.A., PhD (Biology), Senior Researcher, State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;

Pluzhnikov N.N., DSc (Medicine), Professor, Head Researcher, State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;

Tyunin M.A., PhD (Medicine), Deputy Head, Research and Development Test Centre, State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;

Kanevsky B.A., Deputy Head, State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;

Ilyinsky N.S., Deputy Head, Scientific-Research Department, State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation.

СОХРАНЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ К АНТИГЕНАМ SARS-CoV-2. ТРИ ГОДА НАБЛЮДЕНИЯ

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

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

² ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

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

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

Резюме. Пандемия COVID-19 завершилась, однако SARS-CoV-2 продолжает активно циркулировать и мутировать в человеческой популяции. В связи с этим важно понять насколько длительно будет сохраняться постинфекционный и поствакцинальный иммунитет и насколько эффективно уже сформированный иммунитет будет работать против новых мутантных штаммов SARS-CoV-2. Целью данной работы было исследовать гуморальный и клеточный иммунитет у группы переболевших COVID-19 в течение трех лет после первичного заболевания. В продольное исследование были включены 38 взрослых в возрасте 23–72 года, перенесших ПЦР-подтвержденный COVID-19 во второй половине 2020 г. в легкой или среднетяжелой форме. Каждые 6 мес. в течение 3 лет после заболевания эти люди проходили обследование на наличие гуморального и клеточного иммунитета к антигенам SARS-CoV-2. Параметры гуморального иммунитета определяли методом иммуноферментного анализа с помощью наборов «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия) для S-белка и «N-CoV-2-IgG PS» (ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия) для N-белка, клеточный иммунитет оценивали по экспрессии молекулы CD107a на CD8^{high} лимфоцитах при распознавании S- или N-антигенов SARS-CoV-2. Показано, что динамика уровней антител к антигенам SARS-CoV-2 зависит от вида антигена (S- или N-белок), класса антител (IgG или IgA) и индивидуальной истории контактов человека с новыми штаммами SARS-CoV-2. Динамика процента цитотоксических CD8^{high}CD107a⁺ лимфоцитов умеренно положительно коррелирует с динамикой уровня соответствующих анти-S- или N-антител. В то же время изменения уровней как гуморального, так и Т-клеточного ответа на антигены S- или N-белка SARS-CoV-2 слабо отрицательно коррелируют между собой. Обнаружена сильная положительная корреляция между изменениями уровней анти-S IgG-антител и avidности этих антител. Ускользание новых штаммов SARS-CoV-2 за счет частых мутаций от нейтрализации анти-S IgG приводит к индукции новых первичных иммунных ответов на S-антигены SARS-CoV-2 наравне с активацией уже существующих ответов, сформированных на предыдущие штаммы коронавируса. Исследование иммунных ответов на антигены SARS-CoV-2 позволяет не только прогнозировать сохранение высоких уровней анти-S-антител и Т-клеточных ответов на антигены SARS-CoV-2, но и дает бесценный материал для углубленного исследования процессов формирования и поддержания иммунологической памяти.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, антитела, клеточный иммунитет, иммунологическая память, прорывной иммунитет.

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Для цитирования:

Афридонова З.Э., Топтыгина А.П., Семикина Е.Л. Сохранение иммунологической памяти к антигенам SARS-CoV-2. Три года наблюдения // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 35–45. doi: 10.15789/2220-7619-SIM-17596

Citation:

Afridonova Z.E., Toptygina A.P., Semikina E.L. Sustained immunological memory to SARS-CoV-2 antigens. Three years of observation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 35–45. doi: 10.15789/2220-7619-SIM-17596

© Афридонова З.Э., Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-SIM-17596>

SUSTAINED IMMUNOLOGICAL MEMORY TO SARS-CoV-2 ANTIGENS. THREE YEARS OF OBSERVATION

Afridonova Z.E.^a, Topotygina A.P.^{a,c}, Semikina E.L.^{b,d}

^a G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b National Medical Research Center of Children's Health of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^c Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. The COVID-19 pandemic has ended, but SARS-CoV-2 continues to actively circulate and mutate in the human population. In this regard, it is important to understand for how long post-infectious and post-vaccination immunity may last and how effectively established immunity could act against new mutant SARS-CoV-2 strains. The aim was to study humoral and cellular immunity in a group of COVID-19 convalescent subjects within 3 years after the primary infection. The longitudinal study included 38 adults aged 23–72 years with PCR-confirmed mild or moderate COVID-19 in the second half of 2020. Within three-year follow-up after the onset, the subjects were examined every 6 months for the level of humoral and cellular immunity against SARS-CoV-2 antigens. The parameters of humoral immunity were assessed by enzyme immunoassay using “SARS-CoV-2-IgG quantitative-ELISA-BEST” kits (Vector-Best JSC, Novosibirsk, Russian Federation) for S-protein and “N-CoV-2-IgG PS” (Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation) specific to the N-protein. Cellular anti-SARS-CoV-2 immunity was analyzed by evaluating surface CD107a expression on CD8^{high} lymphocytes stimulated with the SARS-CoV-2 S- or N-antigens. It was shown that the dynamics of antibody levels against SARS-CoV-2 antigens depends on antigen (S- or N-protein) type, antibody class (IgG or IgA) as well as individual contact history with new SARS-CoV-2 strains. The dynamics of cytotoxic CD8^{high}CD107a⁺ lymphocyte percentage is moderately positively correlated with that of the corresponding anti-S or N antibody levels. At the same time, change in the levels of both humoral and T-cell responses to SARS-CoV-2 S- or N-protein antigens are weakly negatively correlated with each other. A strong positive correlation was found between changes in the anti-S IgG antibody level and avidity. Avoiding the anti-S IgG neutralization due to frequent mutations of new SARS-CoV-2 strains leads to induced new primary immune responses against SARS-CoV-2 antigens along with the activation of existing responses formed to previous coronavirus strains. The study of immune responses against SARS-CoV-2 antigens allows to predict the persistence of high SARS-CoV-2 anti-S antibody and T-cell response levels.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, antibodies, cellular immunity, immunological memory, breakthrough immunity.

Введение

Пандемия COVID-19 с очевидностью доказала, что ни локдауны, ни тотальное ношение масок, и даже ни противовирусные препараты не способны искоренить циркуляцию SARS-CoV-2 и исключить заболеваемость новой коронавирусной инфекцией. Стало понятно, что основная надежда — на иммунитет, индивидуальный и популяционный как сумму индивидуальных. В связи с этим два важных вопроса необходимо разрешить, чтобы понять, насколько достижима эта надежда. Первое — насколько длительно будет сохраняться постинфекционный и поствакцинальный иммунитет, и второе — насколько эффективно уже сформированный иммунитет будет работать против новых штаммов SARS-CoV-2, вызывающих опасные (VOC).

Уровень вируснейтрализующих антител наилучшим образом коррелирует с защищенностью от COVID-19 [12]. Первоначально было показано, что антительный ответ на инфекцию SARS-CoV-2 быстро нарастал, а через 1–2 месяца также быстро снижался [27]. Дальнейшие наблюдения продемонстрировали, что уровень антител хоть и снижался в несколько раз, но со-

хранялся на детектируемом уровне до года [3, 31] и более [4, 6]. Более высокие уровни IgG-антител к SARS-CoV-2 были связаны с более старшим возрастом, мужским полом и тяжелым течением заболевания [13]. Известно, что T-зависимый путь формирования антител включает 2 независимых варианта: экстрафолликулярный (EF) путь после короткого контакта с T-фолликулярным хелпером протекает в В-зоне вне зародышевых центров и фолликулярный путь в зародышевых центрах (GC). Формируемые в результате плазматические клетки и их антитела принципиально различаются. При EF пути развития формируются короткоживущие плазмоциты, синтезирующие неперестроенные, с малым количеством мутаций, низкоаффинные антитела преимущественно IgM, IgA и IgG3 [32]. Показано, что при тяжелом течении COVID-19 именно EF клетки весьма активно синтезируют антитела, тогда как при легком и среднетяжелом течении преимущество имеют GC клетки [33]. Быстрая наработка EF короткоживущих плазмобластов сопровождается быстрым нарастанием концентрации низкоаффинных IgM, IgA, IgG3 и достаточно быстрым спадом, тогда как формирование GC плазмобластов характеризует-

ся высоким аффинитетом, преимущественно IgG1-субклассом антител и завершается образованием пула долгоживущих плазмочитов [10, 17]. При этом уровень В-клеток памяти продолжает нарастать и созревать даже после элиминации вируса из организма [20]. Помимо вируснейтрализующих антител, которые считаются основным механизмом иммунной защиты [21], в процессе иммунного ответа формируются не нейтрализующие вирус антитела, примером которых являются антитела против нуклеокапсидного N-белка SARS-CoV-2. Для этих антител типично более быстрое нарастание и также более быстрое снижение концентрации, чем для анти-S-антител [15]. Все еще неясна роль таких не нейтрализующих вирус антител в защите от инфицирования SARS-CoV-2.

В начале пандемии постинфекционный и поствакцинальный иммунитет эффективно сдерживал повторные заболевания COVID-19, однако с появлением штамма омикрон стало понятно, что этот и последующие VOC способны прорвать сформированный ранее иммунитет [7]. Характерно, что в этом случае заболевание протекает в легкой или бессимптомной форме. Это может быть объяснено как перекрестными эффектами антител, так и Т-клеточным иммунным ответом, который менее зависим от мутаций вируса [9]. Несмотря на обширные исследования иммунитета к SARS-CoV-2, все еще недостаточно знаний о продолжительности и эффективности такой иммунной защиты.

Целью данной работы было исследовать гуморальный и клеточный иммунитет у группы переболевших COVID-19 в течение трех лет после первичного заболевания.

Материалы и методы

В продольное исследование были включены 38 взрослых в возрасте 23–72 года, перенесших ПЦР-подтвержденный COVID-19 во второй половине 2020 г. в легкой или среднетяжелой форме. Каждые 6 мес. в течение 3 лет после заболевания эти люди проходили обследование на наличие гуморального и клеточного иммунитета к антигенам SARS-CoV-2. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (протокол № 58), обследованные подписывали информированное согласие. Кровь для исследования отбирали в вакуумные пробирки с гепарином или с активатором свертывания.

Для определения гуморального иммунитета сыворотку крови получали центрифугированием, разливали в пробирки Эппендорф и хранили при -70°C . Анти-S IgG-антитела определяли с помощью наборов «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» (АО Вектор-

Бест, Новосибирск, РФ), а анти-N IgG на наборе «N-CoV-2-IgG PS» (ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, РФ) [2]. Субклассы IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2 исследовали с помощью ранее разработанной нами модификации ИФА-метода [5]. Кратко: мы использовали 96-луночные панели с сорбированным полноразмерным S-антигеном вируса SARS-CoV-2 от коммерческого набора «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» (АО Вектор-Бест, Новосибирск, РФ) или с N-белком вируса SARS-CoV-2 от коммерческого набора «N-CoV-2-IgG PS» (ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, РФ) Вместо анти-IgG конъюгатов, входящих в тест-системы, использовали меченные пероксидазой анти-IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 моноклональные антитела (Полигност, Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Все остальные этапы определения антител проводили согласно инструкции к наборам. Аналогично для определения IgA-антител вместо конъюгата из тест-системы использовали меченые пероксидазой анти-IgA антитела (Полигност, Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Для определения авидности использовали вышеуказанные наборы для определения IgG в модификации [4]. Сыворотку каждого испытуемого вносили в лунки двух соседних стрипов, после инкубации и отмывки в лунки первого стрипа вносили по 200 мкл физиологического раствора, в лунки второго стрипа — по 200 мкл денатурирующего раствора мочевины, инкубировали 10 мин при комнатной температуре и отмывали 3 раза. Далее выполняли все процедуры по протоколу к набору «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ».

Выделенные на градиенте плотности ($\rho = 1,077$; ООО «ПанЭко», РФ) мононуклеары в среде RPMI-1640 с добавлением 2мМ L-глутамина, гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «ПанЭко», РФ) вносили в количестве $2,5 \times 10^5$ в лунки 96-луночной стерильной панели, добавляли раствор моненсина в конечной концентрации 10 мкМ и моноклональные антитела к антигену CD107a-PE-Cy5 в конечном разведении 1:100 (контрольная проба), конечный объем в лунке составил 200 мкл. Для стимуляции мононуклеаров S- и N-антигенами SARS-CoV-2 использовали лунки панелей от наборов «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО Вектор-Бест, Новосибирск РФ) и «N-CoV-2-IgG PS» (ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, РФ) в которых на дно лунок сорбирован S- или N-белок вируса SARS-CoV-2, соответственно. Перед началом эксперимента используемые стрипы были простерилизованы с помощью ультрафиолетового облучения 30 мин. Опытные и контрольные пробы инкубировали при 37°C во влажной атмосфере и 5%

CO₂ 20 ч, переносили в пробирки для цитофлуориметрии, отмывали CellWash (300g 5 мин), окрашивали антителами к антигену CD8-FITC 20 мин в темноте при 4°C и отмывали при тех же условиях. Иммунофенотипирование проводили на проточном цитометре BD FACS CantoII (Vecton Dickinson, США). В лимфоидном гейте выделяли гейт лимфоцитов высоко экспрессирующих антиген CD8 (CD8^{high}) и подсчитывали процент клеток CD8^{high}CD107a⁺, представляющих собой цитотоксические Т-лимфоциты, распознавшие S- или N-антиген SARS-CoV-2 и ответивших на это распознавание цитотоксической атакой. Границей спонтанной экспрессии молекулы CD107a на CD8^{high} лимфоцитах считали уровень 1% [5].

Результаты исследований подвергали статистической обработке. Нормальность распределения исследуемых параметров проверяли методом Колмогорова–Смирнова. Количество IgG-антител выражали в ВАУ/мл. Уровень антител представлен в виде медианы (1–3 квартиль); Ме (LQ–HQ). Различия между группами оценивали методом Манна–Уитни. Для параметров процентного уровня субклассов IgG, авидности и клеточного иммунитета была подтверждена гипотеза о нормальности распределения. Уровень IgA представлен в коэффициентах позитивности (КП) как отношение

к отрицательному контролю. Результаты представлены в виде средней арифметической и ее ошибки (M±SE). Корреляции оценивали методом Пирсона. Различия при p < 0,05 считали значимыми.

Результаты

Динамика уровней анти-S и анти-N IgG-антител в сыворотке крови обследованных реконвалесцентов представлена на рис. 1. Из рисунка видно, что концентрация анти-S IgG в интервале 6–12 мес. после заболевания держалась на стабильном уровне 700–800 ВАУ/мл, тогда как концентрация анти-N IgG за этот период снизилась с 945 (376–2525) до 273 (171–687) ВАУ/мл. Через 1,5 года после первичного заболевания, зимой и в начале весны 2022 г. обследованные перенесли повторное заболевание, вызванное штаммом омикрон, что привело к значимому (p < 0,05) повышению уровня анти-S IgG до 1524 (725–2213) ВАУ/мл, а анти-N IgG до 1492 (575–3117) ВАУ/мл. Через полгода после этого концентрация анти-N IgG снизилась до 296 (182–538) ВАУ/мл и сохранялась на сроке до трех лет после первичного заболевания около 200 ВАУ/мл. На тех же сроках уровень анти-S IgG продолжал плавно нарастать до 2069 (751–3719) ВАУ/мл в 3 года после первичного заболе-

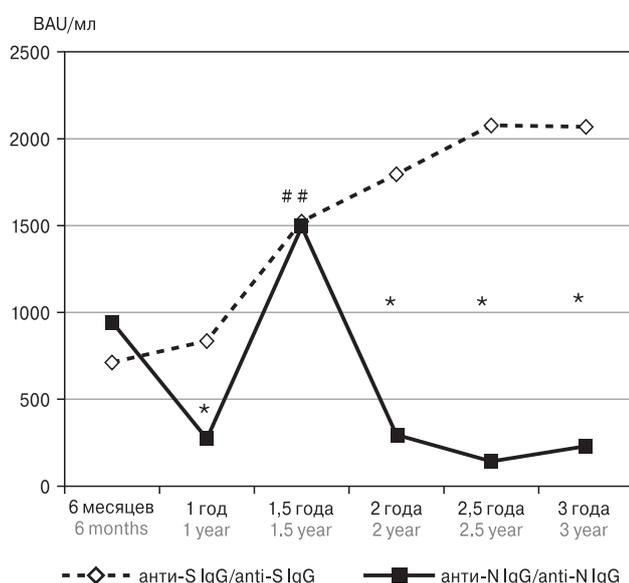


Рисунок 1. Изменение уровней IgG-антител в зависимости от времени после заболевания COVID-19

Figure 1. Temporal post-COVID-19 change in IgG antibody levels

Примечание. *p < 0,05 между уровнем анти-S и анти-N IgG; #p < 0,05 для анти-S и анти-N IgG по сравнению с уровнем на сроке 1 год.

Note. *p < 0.05 between anti-S and anti-N IgG levels; #p < 0.05 for anti-S and anti-N IgG vs 1-year follow-up levels.

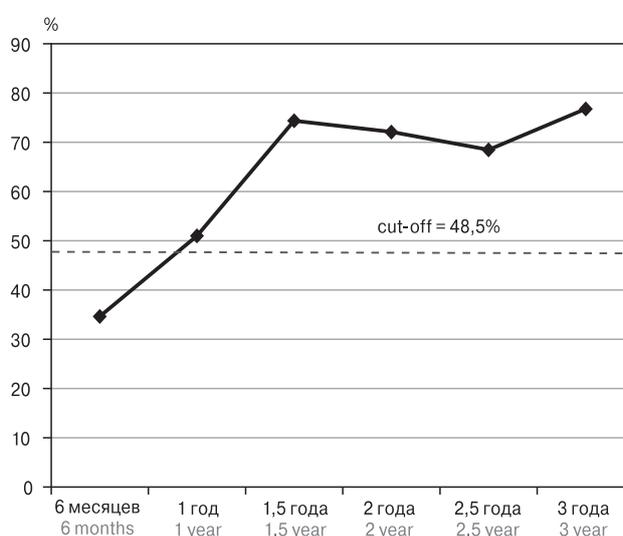


Рисунок 2. Изменение во времени авидности антител к S-белку SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших COVID-19

Figure 2. Temporal serum change in SARS-CoV-2 S protein-specific antibody avidity of COVID-19 convalescent patients

Примечание. Пунктирной линией обозначен уровень cut-off для разделения высоко и низко авидных антител. Note. The dotted line indicates the cut-off level to distinguish between high and low avidity antibodies.

вания. Различия в уровнях анти-N и анти-S IgG на сроках 2 и более года были значимыми ($p < 0,05$). Выявлена умеренная отрицательная корреляция динамики уровней анти-S и анти-N IgG-антител ($r = -0,37$).

Изменение avidности анти-S IgG-антител с течением времени представлено на рис. 2. Через 6 мес. после первичного заболевания avidность антител все еще была низкой: $34,65 \pm 2,11\%$. В предыдущих исследованиях мы рассчитали cut-off между низко- и высокоavidными антителами, который оказался равным $48,5\%$. К году avidность достигла $51,02 \pm 3,61\%$, что следует расценить как высокоavidные антитела. После повторного заболевания штаммом омикрон в 1,5 года avidность достигла уровня $74,5 \pm 3,08\%$ и сохранялась на этом уровне последующие 1,5 года наблюдения. Обнаружена сильная положительная корреляция между динамикой уровней анти-S IgG-антител и avidности этих антител ($r = 0,89$).

Динамика уровня анти-S IgA-антител в зависимости от времени после заболевания, представленная на рис. 3, скорее напоминала кривую динамики анти-N IgG. В начале наблюдения отмечался высокий уровень анти-S IgA: $13,79 \pm 2,34$ КП. К году наблюдения уровень значимо ($p < 0,05$) снизился до $2,18 \pm 0,59$, затем после перенесенного повторного заболевания штаммом омикрон вновь значимо ($p < 0,05$) поднялся до $8,3 \pm 1,72$ с последующим снижением до $3,72 \pm 0,63$ на сроке 2 года и плавным подъемом до $6,1 \pm 0,55$ через 3 года наблюдения. Выявлена умеренная положительная корреляция между изменением уровней анти-S IgA-антител и анти-N IgG ($r = 0,67$).

Известно, что короткоживущие плазматические синтезируют преимущественно IgG3-субкласс, тогда как долгоживущие — преимущественно IgG1-субкласс. Изменения с течением времени спектра субклассов анти-S и анти-N IgG-антител представлены на рис. 4 и в табл. Интересно, что IgG-антитела к антигенам N-белка SARS-CoV-2 были представлены всеми четырьмя субклассами, при этом IgG2 и IgG4 были минорными, а на антигены S-белка SARS-CoV-2 сформировались только антитела субклассов IgG1 и IgG3 с подавляющим преимуществом IgG1. Важно, что после повторного заболевания штаммом омикрон, через 1,5 года после первичного COVID-19 в анти-N ответе стали преобладать IgG1-антитела. Это характерно для вторичного типа иммунного ответа. При этом на более поздних сроках вновь появились и даже преобладали ($55,23 \pm 2,84\%$ на сроке 2,5 года) IgG3-антитела. IgG2- и IgG4-антитела в ответе на N-белок вновь определялись как минорные, менее 3%. Напротив, анти-S-антитела уже на сроке 1 год полностью были представле-

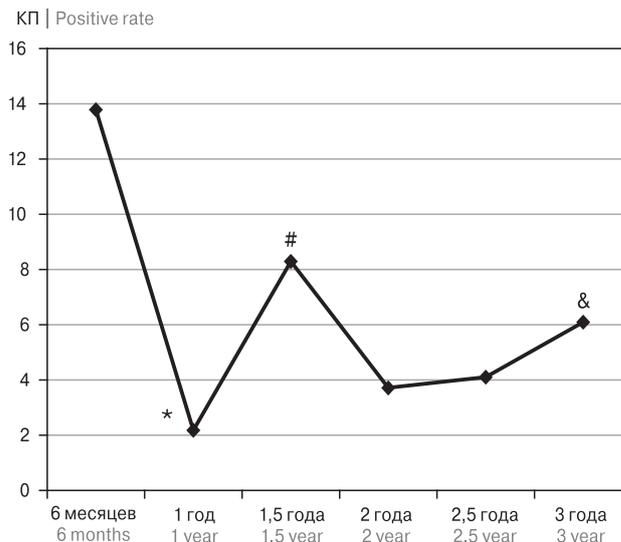


Рисунок 3. Изменение уровня анти-S IgA-антител в зависимости от времени после заболевания COVID-19

Figure 3. Temporal change in post-COVID-19 anti-S IgA antibody levels

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с уровнем на сроке 6 мес.; # $p < 0,05$ по сравнению с уровнем на сроке 1 год; & $p < 0,05$ по сравнению с уровнем на сроке 2 года.

Note. * $p < 0.05$ compared to 6 month-level; # $p < 0.05$ compared to 1-year level; & $p < 0.05$ compared to 2-years level.

ны IgG1-субклассом, что типично для профиля синтеза антител долгоживущими плазматическими. Однако после повторного заболевания штаммом омикрон вновь появились IgG3-антитела ($9,36 \pm 1,26\%$) и при последующих бустерах VOC их уровень вырос до $22,73 \pm 1,87\%$ на сроке через 3 года, что типично для новых первичных ответов на контакт с новыми штаммами. Интересно, что после прорывных инфекций среди анти-S IgG появились также антитела IgG2- и IgG4-субклассов. При этом IgG2-антитела составляли 3–5% от анти-S IgG, тогда как IgG4 после прорывного заболевания, вызванного штаммом омикрон, поднялись до $10,68 \pm 0,93\%$ от анти-S IgG, что составляло $142,61$ ($68,73$ – $338,4$) BAU/мл. У 50% обследованных людей уровень анти-S IgG4 превышал 100 BAU/мл, медиана по этой подгруппе составила $285,7$ ($126,8$ – $615,4$) BAU/мл или $15 \pm 1,57\%$ от анти-S IgG. При дальнейшем бустировании новыми VOC доля IgG2- и IgG4-субклассов в анти-S IgG постепенно снижалась до $0,65 \pm 0,11$ и $2,92 \pm 0,27\%$ соответственно, через 3 года после первичного заболевания. Доля IgG1-субкласса на временном отрезке 1,5–3 года после заболевания сохранялась на уровне 70–75%.

Клеточный иммунный ответ на антигены S- и N-белка SARS-CoV-2 представлен на рис. 5. Через 6 мес. после первичного заболевания был выявлен высокий уровень Т-клеточного ответа на антигены N-белка SARS-CoV-2, со-

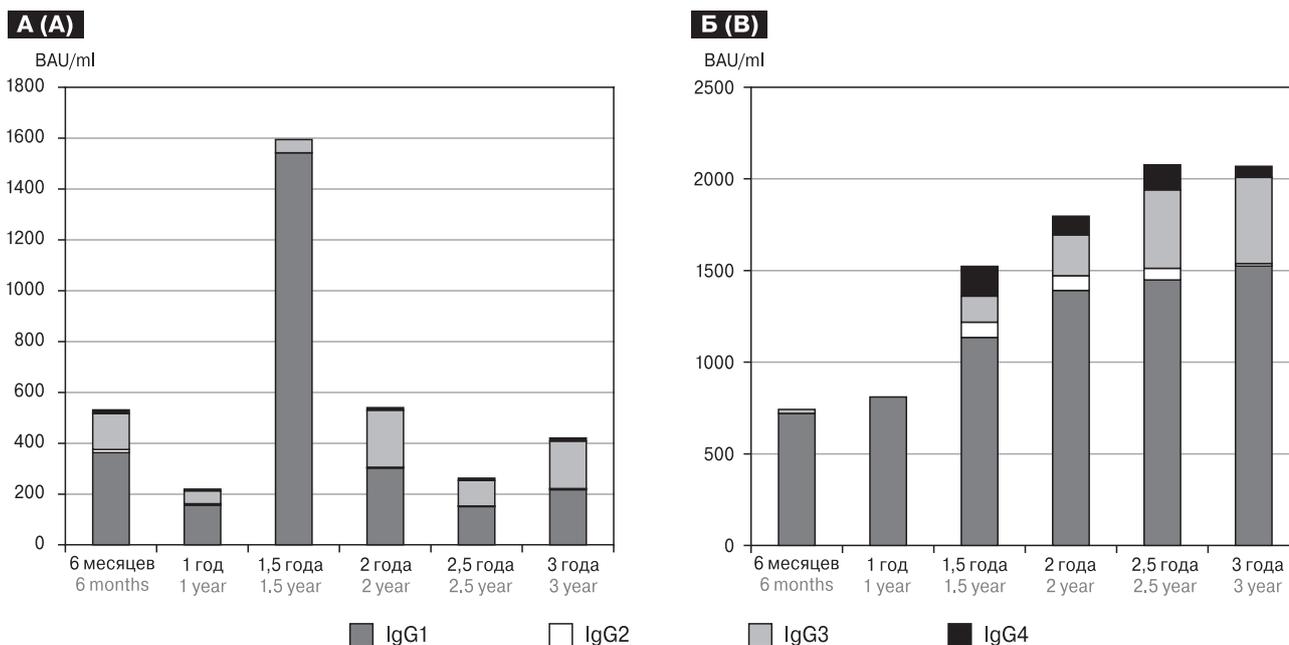


Рисунок 4. Изменение спектра субклассов IgG-антител к антигенам SARS-CoV-2 в зависимости от времени после заболевания COVID-19

Figure 4. Time-dependent change in SARS-CoV-2 antigen-specific IgG subclass spectrum

Примечание. А. N-белок вируса SARS-CoV-2; Б. S-белок вируса SARS-CoV-2.

Note. A. SARS-CoV-2 N-protein; B. SARS-CoV-2 S-protein.

ставивший $15,49 \pm 1,42\%$, который плавно снижался с течением времени до $6,7 \pm 1,15\%$ на сроке 2,5 года и значимо ($p < 0,05$) возрос до $9,15 \pm 1,2\%$ через 3 года от начала заболевания. Выявлена умеренная положительная корреляция между изменением уровней анти-N IgG и динамикой уровней ответов $CD8^+$ лимфоцитов на антигены N-белка SARS-CoV-2 ($r = 0,49$). Клеточный ответ на антигены S-белка SARS-CoV-2 менялся во времени иначе. Через 6 мес. после первичного заболевания он составлял $6,49 \pm 0,88\%$, а после повторного заболевания штаммом омикрон

возрос почти вдвое до $12,25 \pm 1,43\%$, в последующий год он плавно снижался до $7,73 \pm 1,32\%$ и значимо ($p < 0,05$) возрос до $9,79 \pm 0,56\%$ на сроке 3 года от первичного заболевания. Выявлена умеренная положительная корреляция между динамикой изменения уровней анти-S IgG и динамикой уровней ответов $CD8^+$ лимфоцитов на антигены S-белка SARS-CoV-2 ($r = 0,41$). Интересно, что корреляция между динамикой T-клеточных ответов на антигены S- и N-белка SARS-CoV-2 была слабой отрицательной ($r = -0,27$).

Таблица. Динамика спектра субклассов IgG к S- и N-белку SARS-CoV-2 во времени после заболевания (% от общего уровня IgG к этим белкам)

Table. Temporal post-infection pattern of IgG subclass spectrum against SARS-CoV-2 S- and N-proteins (% of IgG total level to these proteins)

	N-белок/N-protein				S-белок/S-protein			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
6 месяцев 6 months	68,35±3,45	2,3±0,14	26,65±1,37	2,7±0,15	97,4±1,1	0	2,6±0,73	0
1 год 1 year	71,38±3,68	2,4±0,13	23,62±1,34	2,6±0,13	100	0	0	0
1,5 года 1.5 years	83,37±3,94	0,6±0,02	14,03±1,15	2±0,18	74,44±2,78	5,52±0,87	9,36±1,26	10,68±0,93
2 года 2 years	55,35±2,73	0,58±0,10	42,43±1,17	1,64±0,12	77,54±2,15	4,42±0,68	12,36±1,47	5,68±0,65
2,5 года 2.5 years	41,61±2,12	0,61±0,11	55,23±2,84	2,55±0,25	69,76±2,07	3,04±0,35	20,61±1,88	6,59±0,84
3 года 3 years	48,42±2,29	0,85±0,23	48,03±2,26	2,7±0,23	73,7±2,95	0,65±0,11	22,73±1,87	2,92±0,27

Обсуждение

За период наблюдения за когортой реконвалесцентов после COVID-19 в России отмечено 8 волн подъема заболеваемости этой инфекцией, вызванных сначала исходным уханьским штаммом, затем альфа, бета, дельта и многими вариантами штамма омикрон. Обследованные нами люди находились внутри пандемии, контактировали последовательно с различными штаммами SARS-CoV-2, иногда с наличием клинических проявлений и ПЦР-подтвержденных повторных заболеваний, а в других случаях бессимптомно, так что на данный момент трудно определить количество таких бустеров. Вопрос о продолжительности сохранения гуморального и клеточного иммунитета волновал исследователей с момента возникновения пандемии, но поскольку это был новый вирус, прямого ответа на него не было. Наблюдения за адаптивным иммунитетом к другим ранее известным коронавирусам показали, что при легкой инфекции, вызванной простудными коронавирусами, антительный ответ исчезал через год после заболевания, а у лиц, перенесших SARS-CoV-1 и MERS инфекции антитела постепенно снижались и не определялись через 4 года после заболевания, тогда как Т-клеточный иммунитет определялся даже спустя 11 лет [28]. Однако эти наблюдения проходили в условиях элиминации вирусов SARS-CoV-1 и MERS. В предыдущих исследованиях на основании моделирования изменения уровней анти-S и анти-N IgG с течением времени на этапе до появления штамма омикрон нами было рассчитано, что через 2 года после заболевания уровень анти-S-антител должен был упасть чуть ниже 300 ВАУ/мл, через 3 года составил бы около 40 ВАУ/мл, а через 4 года опустился бы ниже 10 ВАУ/мл, что считается cut-off между отрицательным и положительным уровнем этих антител [1]. Иными словами расчетная динамика изменения уровня анти-S IgG к SARS-CoV-2 при условии элиминации вируса напоминала бы таковую, выявленную для SARS-CoV-1 и MERS. Однако SARS-CoV-2 продолжает циркулировать и активно мутировать в человеческой популяции. В настоящих исследованиях удалось показать, что уровни анти-S и анти-N IgG-антител по-разному изменялись в течение трехлетнего наблюдения. Сформировавшиеся после первичного заболевания COVID-19 анти-S IgG держались на одном уровне в течение года, а после перенесенного повторного заболевания, вызванного штаммом омикрон и последующих бустеров в результате контактов с циркулировавшими в 2022–2023 гг. новыми VOC, прогрессивно нарастали. Очевидно, повторные контакты с новыми штаммами SARS-CoV-2

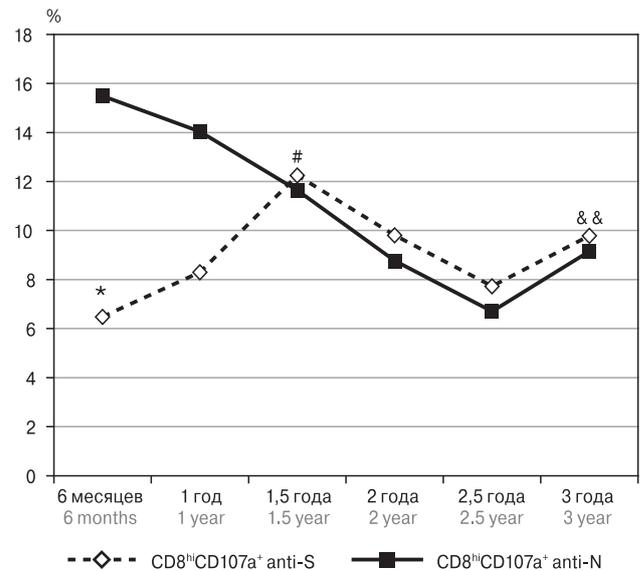


Рисунок 5. Изменение уровней клеточного иммунного ответа на N- и S-белок SARS-CoV-2 в зависимости от времени после заболевания COVID-19

Figure 5. Time-dependent change in levels of cellular SARS-CoV-2 N- and S-protein-specific immune response

Примечание. * $p < 0,05$ между уровнем клеточного ответа на S- и N-белок SARS-CoV-2; # $p < 0,05$ для уровня клеточного ответа на S-белок SARS-CoV-2 по сравнению с уровнем на сроке 1 год; & $p < 0,05$ по сравнению с уровнем на сроке 2,5 года.

Note. * $p < 0.05$ between cellular response levels against SARS-CoV-2 S- and N-protein; # $p < 0.05$ for SARS-CoV-2 S-protein cellular response compared to 1-year level; & $p < 0.05$ compared to 2.5-year level.

стимулируют активность долгоживущих плазматических, сформированных в GC. Аналогичные результаты были получены и другими исследователями, наиболее эффективными в тестах вируснейтрализации были сыворотки от людей с прорывным иммунитетом, перенесших 2 или более заболеваний COVID-19 [24]. Это заключение подтверждает подавляющее количество антител IgG1-субкласса в составе анти-S IgG, которые синтезируют преимущественно клетки памяти. Однако мы предполагали, что повторные бустеры новыми VOC будут сопровождаться исключительно зрелым IgG1-ответом, а на деле оказалось, что при бустерах VOC снова появился IgG3-ответ. Мы считаем, что это след от новых первичных ответов на мутантные участки S-белка. Кроме того, после прорывных инфекций в составе анти-S IgG-антител появились IgG2- и IgG4-субклассы. Иными словами, при ответе иммунной системы на новые VOC параллельно наблюдалось два явления: вторичный тип иммунного ответа на ранее существовавшие эпитопы (долгоживущие плазматические, антитела IgG1-субкласса) и формиро-

вание первичного иммунного ответа на новые мутантные эпитопы (антитела IgG3-субкласса). Косвенно это подтверждает авидность анти-S IgG-антител, которая после перенесенного повторного заболевания штаммом омикрон держалась на уровне около 75%. При наблюдении за отдельными людьми из обследованной группы можно было видеть, что после очередного контакта с VOC индивидуальная авидность анти-S IgG-антител несколько снижалась, а спустя время снова возрастала. Такие колебания в авидности антител мы рассматриваем как отражение процессов суммации высокой авидности антител от вторичного иммунного ответа на «старые» эпитопы и низкой авидности антител первичного иммунного ответа на «новые» мутантные эпитопы. Отдельно следует обсудить появление антител субкласса IgG4. В ряде работ в начале пандемии было показано, что анти-S IgG преимущественно состояли из IgG1- и IgG3-антител [10, 19], но после прорывных инфекций штаммом омикрон стали появляться также и IgG4 анти-S-антитела. Формирование антител значимого уровня IgG4-субкласса наблюдали при повторных вакцинациях мРНК-вакцинами [11]. Оказалось, что синтез значимого уровня IgG4 анти-S-антител тесно коррелирует с уровнем IL-6, тяжестью течения и летальными исходами при COVID-19, а соотношение $IgG4/IgG1 > 0,05$ было предложено как предиктор летального исхода при COVID-19 [8]. В наше исследование были включены люди, перенесшие COVID-19 только в легкой или среднетяжелой форме и после первичного заболевания IgG4 анти-S-антител не было выявлено ни у одного из наблюдаемых. Появление IgG4 анти-S-антител было обнаружено после прорывной инфекции штаммом омикрон и далее после повторных прорывных инфекций новыми VOC. Важно, что после прорывного заболевания штаммом омикрон у 67% обследованных людей соотношение $IgG4/IgG1$ превышало 0,05 и в среднем составило $0,183 \pm 0,022$, тем не менее, эти люди были живы и переносили прорывные инфекции новыми VOC легче, чем первичное заболевание. Еще через год соотношение $IgG4/IgG1$ превышало 0,05 у 33% из обследованной когорты и составило $0,155 \pm 0,016$, а через 3 года после первичного заболевания только у 5 человек соотношение $IgG4/IgG1$ превышало 0,05 и было $0,12 \pm 0,02$. Никто из наблюдаемой когорты за это время не умер, хотя имели неоднократные повторные встречи с SARS-CoV-2, как с проявлением симптомов, так и без них. Известно, что переключение на IgG4 происходит в конце инфекционного процесса, когда патоген элиминирован и требуется завершение иммунного ответа. Это переключение индуцирует повышенный уровень IL-10, продуцируе-

мого индуцированными регуляторными клетками (iTreg), которые и завершают иммунный ответ и индуцируют регенерацию тканей [29]. Это естественный процесс, следовательно, появление IgG4 анти-S-антител, особенно после повторного прорывного заболевания, не является патологией. Тем не менее, была высказана гипотеза, что SARS-CoV-2 при тяжелом течении заболевания может индуцировать преждевременное переключение на синтез IgG4-антител, что приводит к торможению иммунного ответа, хотя вирус все еще не элиминирован из организма, и формируется своеобразная толерантность к SARS-CoV-2, приводящая к летальному исходу [26]. В рамках этой гипотезы, наши 5 обследуемых с все еще высоким уровнем IgG4 анти-S-антител могут быть подвержены более тяжелому течению следующих прорывных вариантов COVID-19 из-за возможного формирования толерантности к SARS-CoV-2, что требует настороженности и более внимательного наблюдения за этими людьми.

Уровень анти-N IgG менялся с течением времени иначе. Следует подчеркнуть, что эти антитела не являются вируснейтрализующими и не препятствуют повторному инфицированию. Отмечался более высокий уровень анти-N IgG после первичного заболевания COVID-19, чем у анти-S IgG, и более быстрое снижение уровня анти-N IgG. Повторный острый пик нарастания концентрации анти-N IgG и такое же быстрое снижение наблюдалось в ответ на повторное заболевание штаммом омикрон. Похожие данные были получены другими независимыми группами исследователей, анти-N IgG демонстрировали быстрое нарастание и снижение концентрации в крови после инфекции или вакцинации [15, 18, 25]. По-видимому, анти-N IgG-антитела синтезируются преимущественно короткоживущими плазмочитами, формирующимися по EF пути. В пользу такого заключения свидетельствует высокий процент IgG3 в составе анти-N IgG. Превалирование субкласса IgG3 в анти-N иммунном ответе отмечали также и другие исследователи [14]. При повторных иммунных ответах на сроке 2–3 года при низком уровне анти-N IgG-ответа вновь наблюдается повышение процента IgG3 в общем анти-N ответе, что говорит о новых первичных ответах на N-белок. Возможно, выявленные различия в профилях субклассов IgG связаны с разной ролью анти-N- и анти-S-антител в защите от повторного заражения SARS-CoV-2.

Сходную динамику с анти-N IgG показали анти-S IgA-антитела, которые также, видимо, синтезируются преимущественно короткоживущими плазмочитами. Быстрые подъемы и спады концентрации анти-S IgA отмечались и другими исследователями [24].

Т-клеточный ответ на антигены S- и N-белка SARS-CoV-2 различались во времени. Так после первичного заболевания COVID-19 отмечался высокий ответ цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов на антигены N-белка SARS-CoV-2, который постепенно снижался с течением времени, что хорошо коррелирует с результатами, полученными в независимых исследованиях [23]. При повторном заболевании штаммом омикрон Т-клеточный ответ на антигены S-белка значительно нарастал, а на антигены N-белка SARS-CoV-2 продолжал снижаться. И только через 3 года после первичного заболевания отмечен прирост Т-клеточных ответов как на антигены S-, так и N-белка SARS-CoV-2, что, по-видимому, связано с бустером новым, сильно отличающимся от первого, штаммом SARS-CoV-2. Ранее было показано, что Т-клеточный иммунный ответ в меньшей степени страдает из-за мутаций вируса за счет перекрестной реактивности Т-клеток памяти [16]. Однако при повторных заболеваниях на фоне активного мутационного процесса SARS-CoV-2, позволяющего вирусу обойти вируснейтрализующую активность антител, роль Т-клеточного иммунитета в защите организма от новых VOC возрастает [22].

Таким образом, в результате трехлетнего наблюдения за когортой реконвалесцентов после первичного заболеваний COVID-19, вызванного уханьским штаммом SARS-CoV-2, в условиях продолжающейся циркуляции вируса и формирования новых VOC, провоцирующих новые эпизоды заболевания или бессимптомного

бустера, удалось показать, что адаптивный иммунитет на антигены S- и N-белка SARS-CoV-2 активно формируется и никуда не исчезает. Динамика уровней антител к антигенам SARS-CoV-2 зависит от вида антигена (S- или N-белок), класса антител (IgG или IgA) и индивидуальной истории контактов человека с новыми VOC. Динамика Т-клеточного иммунного ответа на антигены S- и N-белка SARS-CoV-2 умеренно положительно коррелирует с динамикой уровня соответствующих анти-S- или N-антител. В то же время изменения уровней, как гуморального, так и Т-клеточного ответа на антигены S- или N-белка SARS-CoV-2 слабо отрицательно коррелируют между собой. Ускользание новых VOC за счет частых мутаций от нейтрализации анти-S IgG приводит к индукции новых первичных иммунных ответов на S-антигены SARS-CoV-2 наравне с активацией уже существующих ответов, сформированных на предыдущие штаммы коронавируса. Исследование иммунных ответов на антигены SARS-CoV-2 позволяет не только прогнозировать сохранение высоких уровней анти-S-антител и Т-клеточных ответов на антигены SARS-CoV-2, но и дает бесценный материал для углубленного исследования процессов формирования и поддержания иммунологической памяти. Недостаточные знания в этой области препятствуют быстрой разработке эффективных вакцин, способных формировать долговременную иммунологическую память, как показали исследования адаптивного иммунитета после использования вакцин на основе мРНК [11, 30].

Список литературы/References

1. Афридонова З.Э., Топтыгина А.П., Михайлов И.С. Особенности гуморального и клеточного иммунного ответа на S- и N-белки вируса SARS-CoV-2 // Биохимия. 2024. Т. 89, № 5 (в печати). [Afridonova Z.E., Toptygina A.P., Mikhaylov I.S. Humoral and cellular immune response to SARS-CoV-2 S and N proteins. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*, 2024, vol. 89, no. 5 (in print). (In Russ.)]
2. Зуева Е.В., Беляев Н.Н., Вербов В.Н., Лихачев И.В., Бачинин И.А., Хамитова И.В., Коробова З.Р., Арсентьева Н.А., Тотолян А.А. Характеристика набора реагентов «N-CoV-2-IgG PS» для количественного определения IgG человека к нуклеокапсидному белку SARS-CoV-2 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 4. С. 771–778. [Zueva E.V., Belyaev N.N., Verbov V.N., Likhachev I.V., Bachinin I.A., Khamitova I.V., Korobova Z.R., Arsentieva N.A., Totolian A.A. Characterizing a “N-CoV-2-IgG PS” diagnostic kit to quantify SARS-CoV-2 nucleocapsid protein-specific human IgG antibodies. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 4, pp. 771–778. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-CAN-1904
3. Иванова И.А., Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Омельченко Н.Д., Чемисова О.С., Водопьянов А.С., Березняк Е.А., Соколова Е.П., Носков А.К., Тотолян А.А. Оценка формирования и напряженности адаптивного иммунитета у переболевших COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 319–328. [Ivanova I.A., Filippenko A.V., Trufanova A.A., Omelchenko N.D., Chemisova O.S., Vodopyanov A.S., Bereznyak E.A., Sokolova E.P., Noskov A.K., Totolian A.A. Assessment of formation and durability of adaptive immunity in COVID-19 convalescents. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 319–328. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-AOF-2107
4. Топтыгина А.П., Афридонова З.Э., Закиров Р.Ш., Семикина Е.Л. Поддержание иммунологической памяти к вирусу SARS-CoV-2 в условиях пандемии // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 55–66. [Toptygina A.P., Afridonova Z.E., Zakirov R.Sh., Semikina E.L., Maintaining immunological memory to the SARS-CoV-2 virus during a pandemic. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 55–66. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MIM-2009
5. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Закиров Р.Ш., Афридонова З.Э. Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета у переболевших COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 495–504. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Zakirov R.Sh., Afridonova Z.E. Comparison of the humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescents. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 495–504. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-COT-1809

6. Alejo J.L., Mitchell J., Chang A., Chiang T.P.Y., Massie A.B., Segev D.L., Makary M.A. Prevalence and durability of SARS-CoV-2 antibodies among unvaccinated US adults by history of COVID-19. *JAMA*, 2022, vol. 327, no. 11, pp. 1085–1087. doi: 10.1001/jama.2022.1393
7. Bergwerk M., Gonen T., Lustig Y., Amit S., Lipsitch M., Cohen C., Mandelboim M., Levin E.G., Rubin C., Indenbaum V., Tal I., Zavitan M., Zuckerman N., Bar-Chaim A., Kreiss Y., Regev-Yochay G. Covid-19 breakthrough infections in vaccinated health care workers. *N. Engl. J. Med.*, 2021, vol. 385, no. 16, pp. 1474–1484. doi: 10.1056/NEJMoa2109072
8. Della-Torre E., Lanzillotta M., Strollo M., Ramirez G.A., Dagna L., Tresoldi M. Serum IgG4 level predicts COVID-19 related mortality. *Eur. J. Intern. Med.*, 2021, vol. 93, pp. 107–109. doi: 10.1016/j.ejim.2021.09.012
9. Geers D., Shamier M.C., Bogers S., den Hartog G., Gommers L., Nieuwkoop N.N., Schmitz K.S., Rijsbergen L.C., van Osch J.A.T., Dijkhuizen E., Smits G., Comvalius A., van Mourik D., Caniels T.G., van Gils M.J., Sanders R.W., Oude Munnink B.B., Molenkamp R., de Jager H.J., Haagmans B.L., de Swart R.L., Koopmans M.P.G., van Binnendijk R.S., de Vries R.D., GeurtsvanKessel C.H. SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccinees. *Sci. Immunol.*, 2021, vol. 6, no. 59: eabj1750. doi: 10.1126/sciimmunol.abj1750
10. Hoehn K.B., Ramanathan P., Unterman A., Sumida T.S., Asashima H., Hafler D.A., Kaminski N., Dela Cruz C.S., Sealfon S.C., Bukreyev A., Kleinstein S.H. Cutting edge: distinct B cell repertoires characterize patients with mild and severe COVID-19. *J. Immunol.*, 2021, vol. 206, no. 12, pp. 2785–2790. doi: 10.4049/jimmunol.2100135
11. Irrgang P., Gerling J., Kocher K., Lapuente D., Steininger P., Habenicht K., Wytopil M., Beileke S., Schafer S., Zhong J., Ssebyatika G., Krey T., Falcone V., Schülein C., Peter A.S., Nganou-Makamdop K., Hengel H., Held J., Bogdan C., Überla K., Schober K., Winkler T.H., Tenbusch M. Class switch toward noninflammatory, spike-specific IgG4 antibodies after repeated SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *Sci. Immunol.*, 2023, vol. 8: eade2798. doi: 10.1126/sciimmunol.ade2798
12. Houry D.S., Cromer D., Reynaldi A., Schlub T.E., Wheatley A.K., Juno J.A., Subbarao K., Kent S.J., Triccas J.A., Davenport M.P. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat. Med.*, 2021, vol. 27, pp. 1205–1211. doi: 10.1038/s41591-021-01377-8
13. Klein S.L., Pekosz A., Park H.S., Ursin R.L., Shapiro J.R., Benner S.E., Littlefield K., Kumar S., Naik H.M., Betenbaugh M.J., Shrestha R., Wu A.A., Hughes R.M., Burgess I., Caturegli P., Laeyendecker O., Quinn T.C., Sullivan D., Shoham S., Redd A.D., Bloch E.M., Casadevall A., Tobian A.A. Sex, age, and hospitalization drive antibody responses in a COVID-19 convalescent plasma donor population. *J. Clin. Invest.*, 2020, vol. 130, no. 11, pp. 6141–6150. doi: 10.1172/JCI142004
14. Korobova Z.R., Zueva E.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Liubimova N.E., Khamitova I.V., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Savin T.V., Stanevich O.V., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Changes in anti-SARS-CoV-2 IgG subclasses over time and in association with disease severity. *Viruses*, 2022, vol. 14: 941. doi: 10.3390/v14050941
15. Krutikov M., Palmer T., Tut G., Fuller C., Azmi B., Giddings R., Shrotri M., Kaur N., Sylla P., Lancaster T., Irwin-Singer A., Hayward A., Moss P., Copas A., Shallcross L. Prevalence and duration of detectable SARS-CoV-2 nucleocapsid antibodies in staff and residents of long-term care facilities over the first year of the pandemic (VIVALDI study): prospective cohort study in England. *Lancet Healthy Longev.*, 2022, vol. 3, no. 1, pp. e13–e21. doi: 10.1016/S2666-7568(21)00282-8
16. Kundu R. Narean J.S., Wang L., Fenn J., Pillay T., Fernandez N.D., Conibear E., Koycheva A., Davies M., Tolosa-Wright M., Hakki S., Varro R., McDermott E., Hammett S., Cutajar J., Thwaites R.S., Parker E., Rosadas C., McClure M., Tedder R., Taylor G.P., Dunning J., Lalvani A. Cross-reactive memory T cells associate with protection against SARS-CoV-2 infection in COVID-19 contacts. *Nat. Commun.*, 2022, vol. 13: 80. doi: 10.1038/s41467-021-27674-x
17. Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., Meng W., Rosenfeld A.M., Ittner C.A.G., Weisman A.R., Agyekum R.S., Mathew D., Baxter A.E., Vella L.A., Kuthuru O., Apostolidis S.A., Bershaw L., Dougherty J., Greenplate A.R., Pattekar A., Kim J., Han N., Gouma S., Weirick M.E., Arevalo C.P., Bolton M.J., Goodwin E.C., Anderson E.M., Hensley S.E., Jones T.K., Mangalmurti N.S., Luning Prak E.T., Wherry E.J., Meyer N.J., Betts M.R. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci. Immunol.*, 2020, vol. 5, no. 49: eabd7114. doi: 10.1126/sciimmunol.abd7114
18. Lee N., Jeong S., Lee S.K., Cho E.-J., Hyun J., Park M.-J., Song W., Kim H.S. Quantitative analysis of anti-N and anti-S antibody titers of SARS-CoV-2 infection after the third dose of COVID-19 vaccination. *Vaccines*, 2022, vol. 10: 1143. doi: 10.3390/vaccines10071143
19. Moura A.D., da Costa H.H.M., Correa V.A., de Lima A.K., Lindoso J.A.L., De Gaspari E., Hong M.A., Cunha-Junior J.P., Prudencio C.R. Assessment of avidity related to IgG subclasses in SARS-CoV-2 Brazilian infected patients. *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11: 17642. doi: 10.1038/s41598-021-95045-z
20. Nielsen S.C.A., Yang F., Jackson K.J.L., Hoh R.A., Röltgen K., Jean G.H., Stevens B.A., Lee J.Y., Rustagi A., Rogers A.J., Powell A.E., Hunter M., Najeeb J., Otrelo-Cardoso A.R., Yost K.E., Daniel B., Nadeau K.C., Chang H.Y., Satpathy A.T., Jardetzky T.S., Kim P.S., Wang T.T., Pinsky B.A., Blish C.A., Boyd S.D. Human B cell clonal expansion and convergent antibody responses to SARS-CoV-2. *Cell. Host Microbe.*, 2020, vol. 28, no. 4, pp. 516–525. doi: 10.1016/j.chom.2020.09.002
21. Niu L., Wittrock K.N., Clabaugh G.C., Srivastava V., Cho M.W. A structural landscape of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 receptor binding domain. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 647934. doi: 10.3389/fimmu.2021.647934
22. Nowill A.E., Caruso M., de Campos-Lima P.O. T-cell immunity to SARS-CoV-2: what if the known best is not the optimal course for the long run? Adapting to evolving targets. *Front. Immunol.*, 2023, vol. 14: 1133225. doi: 10.3389/fimmu.2023.1133225
23. Pušnik J., König J., Mai K., Richter E., Zorn J., Proksch H., Schulte B., Alter G., Streeck H. Persistent maintenance of intermediate memory B cells following SARS-CoV-2 infection and vaccination recall response. *J. Virol.*, 2022 vol. 96: e00760-22. doi: 10.1128/jvi.00760-22
24. Pušnik J., Monzon-Posadas W.O., Zorn J., Peters K., Baum M., Proksch H., Schlüter C.B., Alter G., Menting T., Streeck H. SARS-CoV-2 humoral and cellular immunity following different combinations of vaccination and breakthrough infection. *Nat. Commun.*, 2023, vol. 14, no. 1: 572. doi: 10.1038/s41467-023-36250-4
25. Rezaei M., Sadeghi M., Korourian A., Tabarsi P., Porabdollah M., Askari E., Mortaz E., Mahmoudi S., Marjani M., Velayati A.A. Comparative evaluation of SARS-CoV-2 IgG assays against nucleocapsid and spike antigens. *Hum. Antibodies*, 2021, vol. 29, pp. 109–113. doi: 10.3233/HAB-210440

26. Rubio-Casillas A., Redwan E.M., Uversky V.N. Does SARS-CoV-2 induce IgG4 synthesis to evade the immune system? *Biomolecules*, 2023, vol. 13: 1338. doi: 10.3390/biom13091338
27. Sakharkar M., Rappazzo C.G., Wieland-Alter W.F., Hsieh C.L., Wrapp D., Esterman E.S., Kaku C.I., Wec A.Z., Geoghegan J.C., McLellan J.S., Connor R.I., Wright P.F., Walker L.M. Prolonged evolution of the human B cell response to SARS-CoV-2 infection. *Sci. Immunol.*, 2021, vol. 6, no. 56: eabg6916. doi: 10.1126/sciimmunol.abg6916
28. Sariol A., Perlman S. Lessons for COVID-19 immunity from other coronavirus infections. *Immunity*, 2020, vol. 53, no. 2, pp. 248–263. doi: 10.1016/j.immuni.2020.07.005
29. Satoguina J.S., Weyand E., Larbi J., Hoerauf A. T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J. Immunol.*, 2005, vol. 174, pp. 4718–4726. doi: 10.4049/jimmunol.174.8.4718
30. Shrotri M., Navaratnam A.M.D., Nguyen V., Byrne T., Geismar C., Fragaszy E., Beale S., Fong W.L.E., Patel P., Kovar J., Hayward A.C., Aldridge R.W.; Virus Watch Collaborative. Spike-antibody waning after second dose of BNT162b2 or ChAdOx1. *Lancet*, 2021, vol. 398, no. 10298, pp. 385–387. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01642-1
31. Wang Z., Muecksch F., Schaefer-Babajew D., Finkin S., Viant C., Gaebler C., Hoffmann H.H., Barnes C.O., Cipolla M., Ramos V., Oliveira T.Y., Cho A., Schmidt F., Da Silva J., Bednarski E., Aguado L., Yee J., Daga M., Turroja M., Millard K.G., Jankovic M., Gazumyan A., Zhao Z., Rice C.M., Bieniasz P.D., Caskey M., Hatzioannou T., Nussenzweig M.C. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature*, 2021, vol. 595, no. 7867, pp. 426–431. doi: 10.1038/s41586-021-03696-9
32. Woodruff M.C., Ramonell R.P., Nguyen D.C., Cashman K.S., Saini A.S., Haddad N.S., Ley A.M., Kyu S., Howell J.C., Ozturk T., Lee S., Suryadevara N., Case J.B., Bugrovsky R., Chen W., Estrada J., Morrison-Porter A., Derrico A., Anam F.A., Sharma M., Wu H.M., Le S.N., Jenks S.A., Tipton C.M., Staitieh B., Daiss J.L., Ghosn E., Diamond M.S., Carnahan R.H., Crowe J.E. Jr., Hu W.T., Lee F.E., Sanz I. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat. Immunol.*, 2020, vol. 21, no. 12, pp. 1506–1516. doi: 10.1038/s41590-020-00814-z
33. Zost S.J., Gilchuk P., Case J.B., Binshtein E., Chen R.E., Nkolola J.P., Schäfer A., Reidy J.X., Trivette A., Nargi R.S., Sutton R.E., Suryadevara N., Martinez D.R., Williamson L.E., Chen E.C., Jones T., Day S., Myers L., Hassan A.O., Kafai N.M., Winkler E.S., Fox J.M., Shrihari S., Mueller B.K., Meiler J., Chandrashekar A., Mercado N.B., Steinhardt J.J., Ren K., Loo Y.M., Kallewaard N.L., McCune B.T., Keeler S.P., Holtzman M.J., Barouch D.H., Gralinski L.E., Baric R.S., Thackray L.B., Diamond M.S., Carnahan R.H., Crowe J.E. Jr. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. *Nature*, 2020, vol. 584, no. 7821, pp. 443–449. doi: 10.1038/s41586-020-2548-6

Авторы:

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

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

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

Authors:

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

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

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

Поступила в редакцию 07.02.2024
Отправлена на доработку 26.02.2024
Принята к печати 01.03.2024

Received 07.02.2024
Revision received 26.02.2024
Accepted 01.03.2024

РАЗЛИЧИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБЩЕГО АНАЛИЗА КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ COVID-19 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАТУСА ВАКЦИНАЦИИ

А.В. Конюхов^{1,2}, А.М. Костинова^{1,3}, М.Н. Локтионова^{1,4}, М.П. Костинов^{1,5}, А.С. Печеник⁶

¹ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² ФГБНУ Научно-исследовательский институт медицины труда имени академика Н.Ф. Измерова, Москва, Россия

³ ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

⁴ ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

⁵ ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

⁶ ГБУЗ Городская клиническая больница № 29 им. Н.Э. Баумана Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Резюме. *Актуальность.* В связи с проведением масштабных вакцинационных кампаний против коронавируса SARS-CoV-2 по всему миру возникает вопрос о том, как иммунизация может повлиять на результаты общего анализа крови при COVID-19. Цель исследования: изучить различия показателей общего анализа крови у пациентов с COVID-19-инфекцией в зависимости от статуса вакцинации. *Материалы и методы.* Проведен обзор публикаций, где были описаны и представлены показатели общего анализа крови (ОАК) у пациентов с подтвержденным COVID-19 с разделением на вакцинированных и не вакцинированных от инфекционного заболевания, обусловленного вирусом SARS-CoV-2. Впоследствии был проведен анализ результатов зарубежных исследований по представленным основным показателям ОАК с описанием имеющихся различий среди пациентов с легким и среднетяжелым течением подтвержденной инфекции COVID-19. Для анализа результатов учитывались группы пациентов с отсутствием сопутствующих заболеваний, способных прямо или косвенно влиять на показатели ОАК. *Результаты.* Проведенный анализ позволил определить, что показатели ОАК не выходят за пределы референсных значений в большинстве случаев в обеих группах, кроме показателей у лиц с тяжелым течением заболевания. Исключение составляет скорость оседания эритроцитов (СОЭ) (42 [20,5–63,5] ($\Sigma n = 107$, Me [Q₁–Q₃])) мм/ч у невакцинированных лиц. Также несколько меньшее абсолютное значение лимфоцитов наблюдается у вакцинированных ($0,95 [0,58–1,62] \times 10^9/\text{л}$ ($\Sigma n = 441$, Me [Q₁–Q₃])). Отмечен вдвое больший разброс значений квартилей лейкоцитов у вакцинированных, чем у невакцинированных: $7,07 [4,07–12,31] \times 10^9/\text{л}$ ($\Sigma n = 555$, Me [Q₁–Q₃]) против $5,68 [4,02–8,34] \times 10^9/\text{л}$ ($\Sigma n = 2202$, Me [Q₁–Q₃])). Подобная ситуация наблюдается и в значениях моноцитов. *Заключение.* Проведение метааналитических исследований показателей ОАК в случаях заболевания COVID-19 позволяет определить эффективность иммунизации, особенности иммунного ответа, а также выявить основные тенденции в динамике значений основных показателей крови среди невакцинированных и вакцинированных лиц в целом или определенными иммунобиологическими препаратами.

Ключевые слова: COVID-19, общий анализ крови, вакцинация, лимфоциты, лейкоциты, тромбоциты.

Адрес для переписки:

Конюхов Алексей Владимирович
105275, Россия, Москва, пр. Буденного, 31,
ФГБНУ НИИ институт медицины труда имени академика
Н.Ф. Измерова.
Тел.: 8 (916) 042-45-23. E-mail: poiuytui@yandex.ru

Contacts:

Alexey V. Konyuhov
105275, Russian Federation, Moscow, Budenogo pr., 31,
Izmerov Research Institute of Occupational Health.
Phone: +7 (916) 042-45-23. E-mail: poiuytui@yandex.ru

Для цитирования:

Конюхов А.В., Костинова А.М., Локтионова М.Н., Костинов М.П., Печеник А.С. Различия показателей общего анализа крови у пациентов с диагнозом COVID-19 в зависимости от статуса вакцинации // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 46–56. doi: 10.15789/2220-7619-DIS-17085

Citation:

Konyuhov A.V., Kostinova A.M., Loktionova M.N., Kostinov M.P., Pechenik A.S. Differences in complete blood count parameters in patients with COVID-19 diagnosis based on vaccination status (literature review) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 46–56. doi: 10.15789/2220-7619-DIS-17085

DIFFERENCES IN COMPLETE BLOOD COUNT PARAMETERS IN PATIENTS WITH COVID-19 DIAGNOSIS BASED ON VACCINATION STATUS (LITERATURE REVIEW)

Konyuhov A.V.^{a,b}, Kostinova A.M.^{a,c}, Loktionova M.N.^{a,d}, Kostinov M.P.^{a,e}, Pechenik A.S.^f

^a I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^b Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, Russian Federation

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

^d Central Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russian Federation

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

^f N.E. Bauman Clinical City Hospital No. 29, Moscow, Russian Federation

Abstract. Relevance. Due to the large-scale vaccination campaigns against the SARS-CoV-2 coronavirus taking place worldwide, the question arises as to how vaccination may affect complete blood count (CBC) parameters in COVID-19 cases. **Research objective:** assess differences in complete blood count parameters in COVID-19 patients based on their vaccination status. **Materials and methods.** A review of publications was conducted describing and presenting the complete blood count parameters in patients with verified COVID-19, by stratifying them into vaccinated and unvaccinated individuals against the SARS-CoV-2 virus-caused disease. Subsequently, a meta-analysis of the results for each CBC parameter was carried out by describing identified differences among patients with mild and moderate COVID-19, lacking comorbidities affecting CBC indicators. **Results.** The analysis conducted allowed to determine that the complete blood count parameters do not exceed the reference range in most cases in both groups, excepting those of individuals with a severe disease course. The exception is the erythrocyte sedimentation rate (ESR) (42 [20.5–63.5] ($\Sigma n = 107$, Me [Q₁–Q₃])) mm/h in unvaccinated individuals. Also, a slightly lower absolute lymphocyte count is observed in vaccinated individuals (0.95 [0.58–1.62] $\times 10^9/L$ ($\Sigma n = 441$, Me [Q₁–Q₃])). There is a twofold greater range of leukocyte quartile values in vaccinated individuals compared to unvaccinated individuals: 7.07 [4.07–12.31] $\times 10^9/L$ ($\Sigma n = 555$, Me [Q₁–Q₃]) vs 5.68 [4.02–8.34] $\times 10^9/L$ ($\Sigma n = 2202$, Me [Q₁–Q₃])). A similar pattern is observed for monocytes. **Conclusion.** Conducting a meta-analysis of laboratory parameters in COVID-19 cases among vaccinated and unvaccinated individuals allows for determining the effectiveness of vaccination as well as identify the major trends in dynamic changes for essential blood parameters among unvaccinated and vaccinated individuals in general or with certain immunobiological preparations.

Key words: COVID-19, full blood count, vaccination, lymphocytes, leucocytes, thrombocytes.

Введение

Как и любая иммунизация, вакцинация против коронавирусной инфекции является эффективным методом профилактики заболевания. На момент проведения настоящего исследования известно о 44 различных вакцинах, применяющихся для профилактики коронавирусной инфекции или проходящих испытания в целях дальнейшего применения [36]. Вакцины от COVID-19, которые были одобрены к использованию, доказали свою эффективность в предотвращении тяжелых форм заболевания и смертности. Например, по данным первичных исследований, Pfizer-BioNTech вакцина имеет 95% эффективность в предотвращении заболевания COVID-19 [1], Moderna — до 94% эффективности [28], Johnson&Johnson — более 66,5% эффективности [34], отечественная же вакцина Гам-Ковид-Вак (Спутник V) в ходе начальных испытаний — 92% [26]. Тем не менее, несмотря на отличающуюся эффективность применяемых вакцин, в многочисленных широкомасштабных сравнительных исследованиях целесообразности вакцинации было продемонстрировано снижение заболеваемости, количества тяжелых форм и осложнений (пневмонии, дыхательная недостаточность, тром-

бозы, неврологические осложнения), а также смертности от коронавирусной инфекции среди вакцинированных [3, 5, 7, 17, 30, 34, 38, 41].

Однако добиться стойкого снижения заболеваемости за счет массовой вакцинации на сегодняшний день не представляется возможным: известно, что как ранее переболевшие, так и вакцинированные лица повторно заражаются коронавирусом [10, 29, 31]. Кроме того, эффективность вакцины может зависеть от многих факторов, таких как возраст, сопутствующая патология, базисный прием определенных групп лекарственных препаратов, образ жизни и др. Также стоит учитывать особенности строения самого коронавируса SARS-CoV-2, а именно — его способность к мутациям, что может приводить к снижению специфического иммунитета после введенной ранее вакцины на основе другого штамма [20].

COVID-19 — это острое инфекционное заболевание дыхательных путей, возбудителем которого является новый коронавирус — SARS-CoV-2. Попадая в клетки человека через S-гликопротеин, он связывается с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2), который экспрессируется в различных органах, включая легкие, почки, поджелудочную железу, кишечник и сердце, что обуславливает повышение вирусной

нагрузки на многие органы и ткани организма. Наличие хронических сопутствующих патологий ввиду нарушения регуляции иммунного ответа осложняют течение основного заболевания. Так, например, при сахарном диабете и ожирении увеличивается образование адипоцитарных клеток, обусловленное повышенной экспрессией АПФ2, которые превращают адипоциты и липофибробласты в резервуары для вируса [12], что играет существенную роль в патогенном ответе на коронавирусную инфекцию.

При коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, нередко наблюдаются нарушения иммунной системы: изменение работы клеточного иммунитета, лимфопения, «цитокиновый шторм» [9]. Нарушения в функционировании иммунной системы прослеживаются и в показателях ОАК.

Наиболее поддающимися изучению показателями воспалительной реакции являются параметры ОАК и уровень С-реактивного белка (СРБ), в то время как содержание прокальцитонина и ферритина в сыворотке крови оказалось менее информативным, в том числе в плане прогноза, фактором. По данным исследований уровень СРБ является ключевым лабораторным биомаркером-индикатором, который сигнализирует о необходимости терапии противовоспалительного характера [1, 8]. Однако оборудование для его определения имеется не во всех медицинских учреждениях, в отличие от оборудования для проведения ОАК.

COVID-19 — это системная инфекция, оказывающая значительное влияние на кроветворную систему и гемостаз. Одним из наиболее распространенных осложнений COVID-19 является гиперкоагуляция [6]. Постепенное повышение уровня D-димера в ходе заболевания тесно связано с ухудшением состояния пациента и неблагоприятным прогнозом. Другие маркеры гиперкоагуляции, такие как удлинение протромбинового времени (ПВ) и активированного частичного тромбoplastинового времени (АЧТВ), увеличение продуктов распада фибрина, тяжелая тромбоцитопения, приводят к развитию синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдрома), требующего немедленного медицинского вмешательства. Пациенты, инфицированные коронавирусом SARS-CoV-2, независимо от того, находятся ли они в стационаре или лечатся амбулаторно, подвержены высокому риску развития венозной тромбоэмболии (ВТЭ), в связи с чем настоятельно рекомендуется ранняя и длительная фармакологическая тромбопрофилактика низкомолекулярным гепарином [2, 11]. Однако в обзоре 9 опубликованных в 2020 г. исследований, напротив, сообщалось о более низком количестве тромбоцитов у пациентов с тяжелой формой COVID-19 [25].

Во время инкубационного периода, который составляет от одного дня до двух недель, а также в начале проявлений заболевания, количество лейкоцитов и лимфоцитов в ОАК в норме или слегка снижено у вакцинированных и невакцинированных пациентов. При виремии SARS-CoV-2 в основном поражает ткани, экспрессирующие высокие уровни рецепторов АПФ2, такие как легкие, сердце и желудочно-кишечный тракт. Через 7–14 дней после проявления первичных симптомов обнаруживаются клинические симптомы, связанные с системным повышением в крови цитокинов. В этот период лимфопения становится явно выраженной [23]. Так, в ретроспективном исследовании, проведенном в Ухане в 2020 г., у 85% пациентов с тяжелой формой заболевания наблюдалась лимфопения [39]. Аналогичные данные о лимфопении сообщаются в исследованиях клиник Сингапура и Вашингтона [13, 16, 40].

Японскими исследователями в 2023 г. проведен анализ по оценке изменения концентраций лейкоцитов и тромбоцитов среди здоровых вакцинированных лиц и больных COVID-19 (без уточнения статуса вакцинации в прошлом). Результаты исследования показали отсутствие значительного роста лейкоцитов и тромбоцитов после всех этапов вакцинации по сравнению с их уровнем перед вакцинацией, и, полученные результаты имели степень достоверности, равную $p \leq 0,01$ (после третьего этапа по сравнению с контрольным, предпрививочным, анализом). По данным исследований концентраций лейкоцитов и тромбоцитов у заболевших COVID-19 можно считать, что данные показатели тем выше, чем тяжелее течение заболевания. Так, у пациентов в легкой форме COVID-19 показатели лейкоцитов и тромбоцитов не отличаются от вакцинированных тремя дозами мРНК-вакциной. Но среднее значение лейкоцитов и тромбоцитов у лиц с тяжелой формой COVID-19 выше более чем в 2 и 4 раза соответственно, чем у здоровых, полностью привитых лиц [43].

Коллегами из Узбекистана было представлено исследование с данными ОАК у пациентов с различными формами COVID-19 и контрольной группы здоровых лиц, однако статус вакцинации в обследуемых группах указан не был. Так, у лиц со среднетяжелой формой течения заболевания показатель лейкоцитов соответствовал $16 \pm 1,3 \times 10^9/L$ ($p < 0,001$), у $80 \pm 8,2\%$ ($p < 0,01$) отмечалась нейтрофилия, а лимфоцитопения была выявлена всего у $14 \pm 2,5\%$ ($p < 0,001$) пациентов. У пациентов с тяжелой формой течения значения перечисленных показателей несколько выше [21].

Отечественными исследователями проводился анализ результатов обследования 206

пациентов, которые поступали в стационары г. Москвы и Московской области с диагнозами: U07.1 Коронавирусная инфекция COVID-19, вирус идентифицирован; U07.2 Коронавирусная инфекция COVID-19, вирус не идентифицирован; J12.9 Внебольничная пневмония. Возраст пациентов составлял 25–98 лет (средний возраст $54,8 \pm 7,4$ года). Из стационара после выздоровления были выписаны 197 пациентов, 6 были переведены в реанимационное отделение, где скончались, 3 больных умерли в отделении.

У всех больных, вне зависимости от статуса, были выявлены изменения мегакариоцитарного, эритроцитарного и гранулоцитарного ростков крови. Путем сопоставления анамнеза течения заболевания, оценки гематологических показателей были выявлены основные изменения, обусловленные влиянием COVID-19. Наиболее существенным изменением в эритроцитарном ростке костного мозга (28,6%) отмечено изменение параметров гемоглобина. Данный факт показывает снижение показателей в период госпитализации менее чем у 20% пациентов. У более 9% больных данные изменения присутствовали до госпитализации.

У 19–20% пациентов число эритроцитов и показатели гемоглобина в крови были увеличены, что указывает на усиление эритропоэза в костном мозге. Более интенсивный процесс отмечен у пациентов с тяжелой формой гипоксии, ранее невакцинированных. Изменения в мегакариоцитарном ростке выражались тенденцией к снижению числа нормальных тромбоцитов и увеличению макроцитарных форм (41%). Данный фактор указывает на повышение расхода клеток, развитие процесса тромбообразования внутри сосудов и выделение молодых форм тромбоцитов меньшего объема. Изменение числа лейкоцитов в ОАК у больных COVID-19 и пневмонией показало, что случаи лейкопении встречались у 7% пациентов, повышение числа лейкоцитов — у 21%, в то время как лимфопения наблюдалась в 40% случаев, что на 14% больше случаев лимфоцитоза [4].

Материалы и методы

Проведен анализ 12 зарубежных источников, содержащих данные ОАК, взятые на 3–10 день после госпитализации у взрослых и пожилых пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом COVID-19 легкой, средней и тяжелой формы течения, находившихся на стационарном лечении. Для сравнения показателей у вакцинированных и невакцинированных были сопоставлены суммирующие выборки из исследований. Также показатели ОАК сравнивались с референсными значениями для взрослого человека. Включались исследования, изучающие влияние вакцинации

на тяжесть течения и количество осложнений от COVID-19, в том числе с сопутствующими соматическими заболеваниями, а также исследования с разбором клинических случаев. В учет брались результаты исследований показателей ОАК, выполненные по значениям медианы с учетом 1 и 3 квартиля. Сравнительный анализ результатов исследований проводился при помощи суммации медианных значений и расчета средней арифметической.

Исключался учет:

– показателей ОАК среди пациентов с летальным исходом вследствие COVID-19 (как среди вакцинированных, так и невакцинированных);

– показателей ОАК у пациентов с микстинфекцией (COVID-19 в сочетании с другими инфекционными заболеваниями);

– показателей ОАК среди пациентов с COVID-19, параллельно находящихся на лечении ряда заболеваний в стадии обострения (пациенты с онкологическими, аутоиммунными заболеваниями и т.д.), и у лиц после трансплантации.

Результаты вышеупомянутых исследований стирают причинно-следственную связь между влиянием вакцины от коронавирусной инфекции на показатели ОАК и должны выделяться в отдельную категорию анализа данных по влиянию вакцинации на тяжесть течения или смертность от COVID-19. Однако показатели ОАК у пациентов, находившихся на ИВЛ и других реанимационных мероприятиях учитывался в настоящем исследовании.

В учет вакцинированных от коронавирусной инфекции пациентов брались в том числе когорты, где вакцинация была не стопроцентной. Допускались в данную категорию когорты с общим процентом вакцинации свыше 85%. При этом в учет вакцинированных против коронавирусной инфекции пациентов брались все лица, иммунизированные, по меньшей мере, одной дозой любой из зарегистрированных в мире вакцин за все время пандемии.

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи IBM SPSS Statistics 26.0 и Microsoft Office Excel 2019. Данные были проверены на нормальность распределения при помощи одновыборочного критерия Колмогорова–Смирнова с учетом коррекции значимости Лильефорса. Статистическая значимость различий независимых выборок с нормальным распределением оценивалась с помощью непарного t-критерия Стьюдента с учетом критерия равенства дисперсий Ливиня. Статистическая значимость различий независимых выборок с ненормальным распределением оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

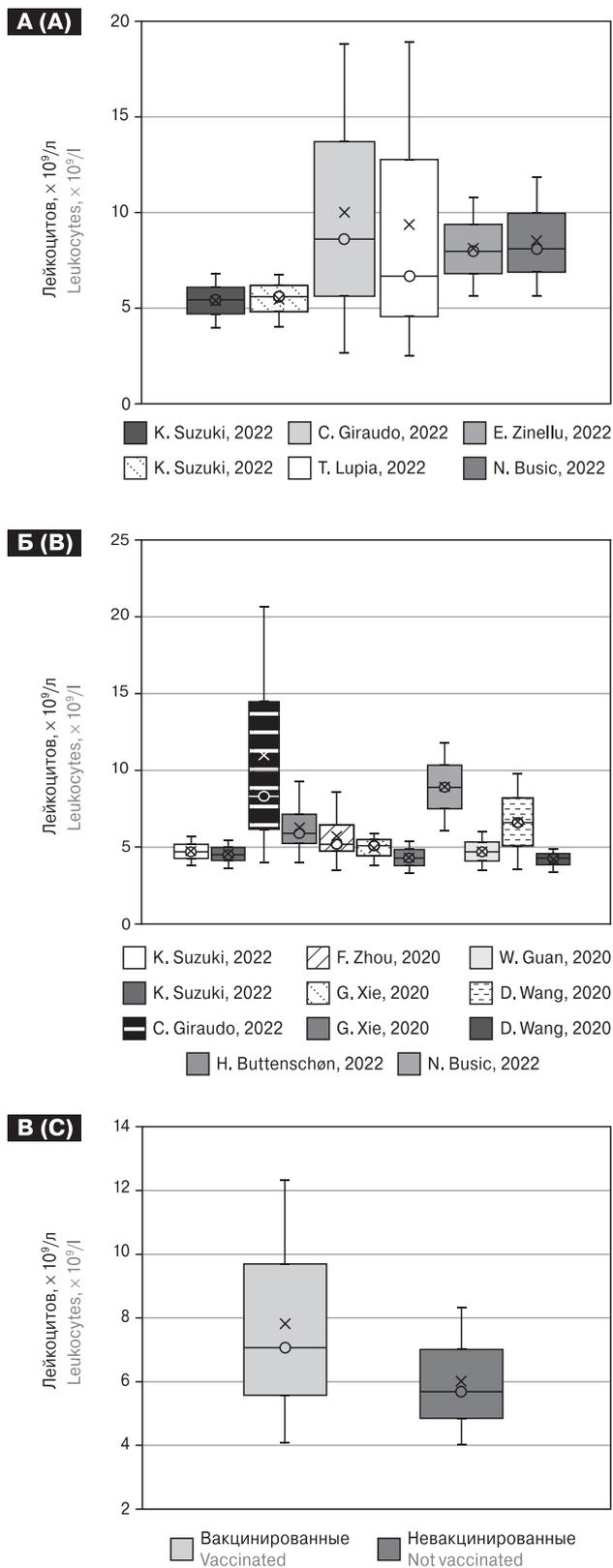


Рисунок 1. Медианные значения количества лейкоцитов у вакцинированных (А) и невакцинированных (Б) больных COVID-19 и их сравнение (В)
 Figure 1. Median values of WBC in vaccinated (A) and unvaccinated (B) patients with COVID-19 and their comparison (C)

Результаты и обсуждение

Медиана показателя лейкоцитов у вакцинированных равна $7,07 [4,07-12,31] \times 10^9/l$ ($\Sigma n = 555$, Me $[Q_1-Q_3]$), у невакцинированных составляет $5,68 [4,02-8,34] \times 10^9/l$ ($\Sigma n = 2202$, Me $[Q_1-Q_3]$). Несмотря на четырехкратное различие по количеству лиц в выборках можно судить о более высоком уровне лейкоцитов у вакцинированных, чем у невакцинированных. Полученные результаты не выходят за границы референсных значений в обоих случаях. Также можно предположить, что более высокое среднее содержание лейкоцитов в группе вакцинированных позволяет эффективней реагировать на коронавирус SARS-CoV-2, а это в свою очередь может обуславливать положительный эффект вакцинации. В качестве альтернативной точки зрения предполагается, что более высокий уровень лейкоцитов связан с большим вкладом когорт тяжелых случаев COVID-19 в группе вакцинированных, поскольку в первоисточниках систематически сообщается о более высоком уровне лейкоцитов у лиц с тяжелым течением COVID-19. Значения 1 и 3 квартилей, а также медианы между разными исследованиями зачастую не пересекаются [14, 15, 18, 19, 27, 32, 35, 37, 42, 44]. Распределение данных о лейкоцитах у заболевших в изученной литературе представлены на рис. 1А и 1Б, средне-медианные значения по всем указанным источникам — на рис. 1В. Данные группы невакцинированных лиц относятся к ненормально распределенным. Данные вакцинированных лиц распределены нормально. Статистическая значимость различий двух групп отсутствует ($p > 0,05$).

Показатель медианы эритроцитов у вакцинированных равен $4,46 [4,14-4,89] \times 10^{12}/l$ ($\Sigma n = 210$, Me $[Q_1-Q_3]$), у невакцинированных — составляет $4,51 [4,12-5,44] \times 10^{12}/l$ ($\Sigma n = 21$, Me $[Q_1-Q_3]$) [24].

В настоящее время известно, что коронавирусная инфекция может провоцировать гемолиз. Однако исследований, демонстрирующих количественное содержание эритроцитов в крови пациентов с COVID-19, недостаточно, что показывают результаты данного анализа. Выборка лиц в группе невакцинированных составляет 21 человек, что сравнить с 210 вакцинированными не объективно. Однако оба значения средней медианы эритроцитов показывают такое значение, которое близко к нижней границе нормы, что может косвенно подтверждать факт частичного гемолиза у лиц с COVID-19.

Медиана уровня гемоглобина у вакцинированных равна $134 [118-146] г/л$ ($\Sigma n = 490$, Me $[Q_1-Q_3]$), у невакцинированных составляет $132 [118-148] г/л$ ($\Sigma n = 1774$, Me $[Q_1-Q_3]$). Различия в показателях гемоглобина между группами незначительны как по медиане, так и по квартилям.

Полученные значения не выходят за пределы референсных в обеих группах. Признаков гемолиза на больших выборках не обнаружено [14, 15, 19, 24, 33, 37, 42, 44].

Распределение данных о гемоглобине у заболевших в изученной литературе представлены на рис. 2А и 2Б, средне медианные значения по всем указанным источникам — на рис. 2В. Расчет данных группы невакцинированных лиц невозможно провести в связи с малым количеством (меньше пяти) значений в выборке. Данные вакцинированных лиц распределены нормально. Статистическая значимость различий двух групп отсутствует ($p > 0,05$).

Средне медианные показатели гематокрита, размера эритроцитов, содержания и концентрации гемоглобина в эритроцитах не выходили за пределы референсных во всех случаях. Сравнение между группами вакцинированных и невакцинированных лиц данных показателей не проводилось из-за малого значения выборки невакцинированных ($\Sigma n = 21$) во всех показателях [24]. Можно предположить, что наличие факта вакцинации не влияет (или положительно влияет) на количественный и качественный состав эритроцитов у лиц лишь в период заболевания COVID-19.

Медиана показателя тромбоцитов у вакцинированных равна $202 [152-276] \times 10^9/\text{л}$ ($\Sigma n = 733$, Ме $[Q_1-Q_3]$), у невакцинированных составляет $173 [139-219] \times 10^9/\text{л}$ ($\Sigma n = 2182$, Ме $[Q_1-Q_3]$). Несмотря на известные и частые факты тромбоза у больных COVID-19 показатели тромбоцитов в двух группах не выходят за пределы референсных значений. Вероятно, в развитии тромбоза играют роль другие факторы свертываемости, например экспрессия тканевого фактора на моноцитах и макрофагах [6]. Однако в группе вакцинированных средне медианные значения тромбоцитов несколько выше, чем у невакцинированных. Некоторые квартильные значения выходят за пределы референсных. Более высокий уровень тромбоцитов в группе вакцинированных также может быть связан с большим вкладом когорт тяжелых случаев COVID-19 в данной группе. Для объективизации данных рекомендуется сопоставление данных на равных выборках [13, 14, 15, 19, 24, 27, 32, 33, 37, 42]. Распределение данных о тромбоцитах у заболевших в изученной литературе представлены на рис. 3А и 3Б, средне медианные значения по всем указанным источникам — на рис. 3В. Данные группы невакцинированных и вакцинированных лиц распределены нормально. Однако расчет статистической значимости различий двух групп по непарному t-критерию Стьюдента неприменим в силу малого критерия равенства дисперсий Ливиния: $p = 0,046$, в связи с чем применимы непараметрические мето-

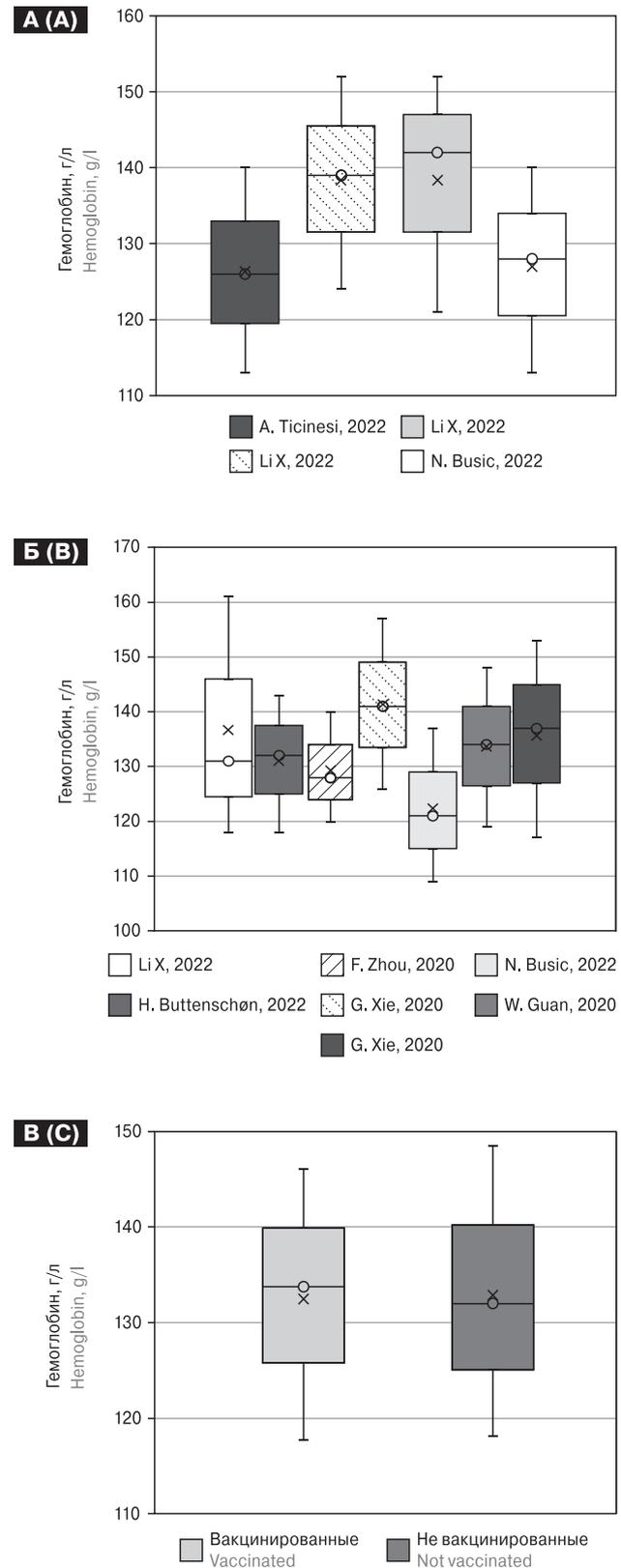


Рисунок 2. Медианные значения уровня гемоглобина у вакцинированных (А) и невакцинированных (Б) больных COVID-19 и их сравнение (В)

Figure 2. Median values of HGB in vaccinated (A) and unvaccinated (B) patients with COVID-19 and their comparison (C)

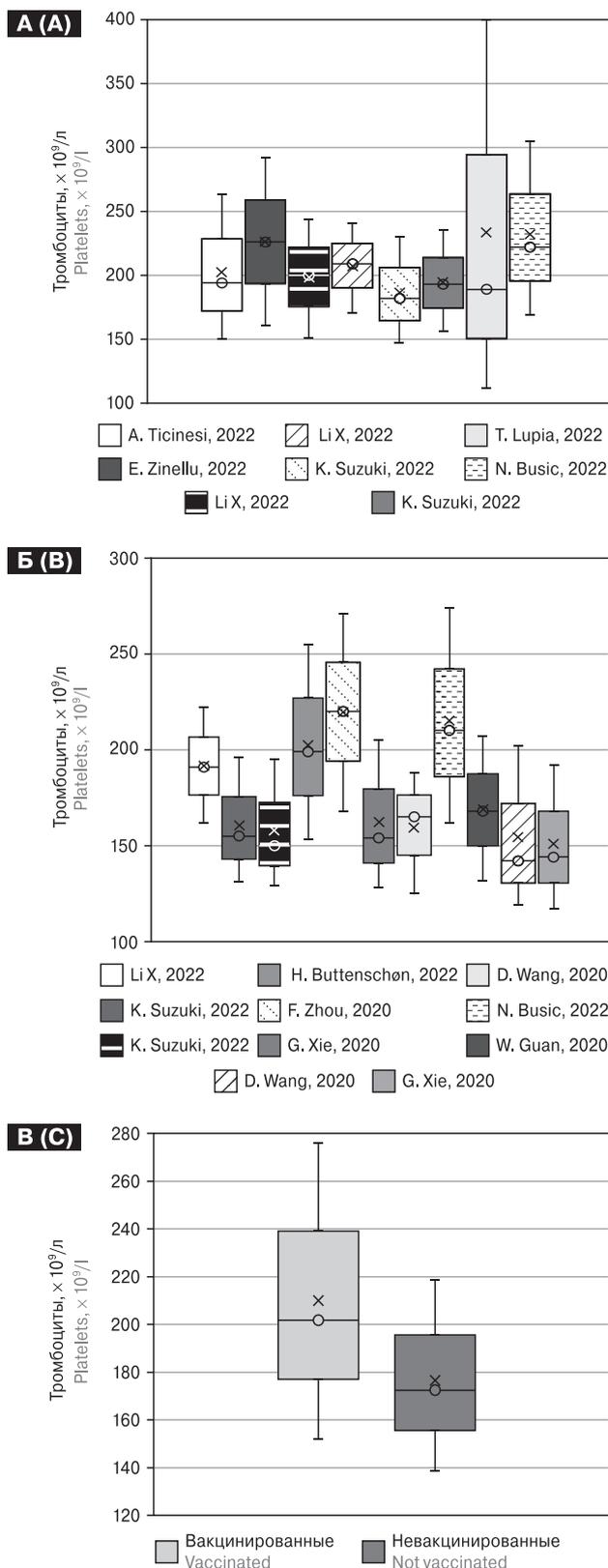


Рисунок 3. Медианные значения количества тромбоцитов у вакцинированных (А) и невакцинированных (Б) больных COVID-19 и их сравнение (В)

Figure 3. Median values of PLT in vaccinated (A) and unvaccinated (B) patients with COVID-19 and their comparison (C)

ды оценки уровня статистической значимости. Анализ по критерию Манна–Уитни показал $p < 0,05$, что свидетельствует о наличии статистической значимости различий двух групп — вакцинированных и невакцинированных.

Согласно полученным данным, вакцинация, предшествовавшая заболеванию COVID-19, не оказывала влияния на средний объем тромбоцитов [14, 15, 19, 24, 24, 32, 35, 37, 42, 44].

Полученные среднемедианные значения СОЭ у вакцинированных составляет 24 [11,5–37,5] мм/ч ($\Sigma n = 210$, Me [Q₁–Q₃]), у невакцинированных — 42 [20,5–63,5] мм/ч ($\Sigma n = 107$, Me [Q₁–Q₃]). Имеется отклонение среднемедианного значения у невакцинированных. Показатель СОЭ у вакцинированных несколько повышен, но входит в нормативные границы. СОЭ как один из маркеров воспаления в данном случае может свидетельствовать, что вакцинированные от коронавируса SARS-CoV-2 лица легче переносят само заболевание COVID-19. Для объективизации данных рекомендуется сопоставление данных на равных выборках с большим количеством участников исследования [24, 37].

Медиана нейтрофилов у вакцинированных равна 4,88 [3,19–6,88] × 10⁹/л ($\Sigma n = 695$, Me [Q₁–Q₃]), у невакцинированных составляет 3,99 [2,63–5,89] × 10⁹/л ($\Sigma n = 614$, Me [Q₁–Q₃]). Показатель группового различия нейтрофилов в данном случае является наиболее объективным в силу одинаковых выборок вакцинированных и невакцинированных. Среднемедианные данные нейтрофилов у невакцинированных свидетельствуют о некотором снижении показателя, незначительно выходящего за нижнюю границу установленной нормы. Но поскольку и общее количество лейкоцитов у вакцинированных выше — можно наблюдать корреляцию нейтрофилов с лимфоцитами между группами вакцинированных и невакцинированных [14, 32, 33, 35, 37, 44].

Показатель медианы лимфоцитов у вакцинированных равен 0,95 [0,58–1,62] × 10⁹/л ($\Sigma n = 441$, Me [Q₁–Q₃]), у невакцинированных составляет 1,01 [0,65–1,42] × 10⁹/л ($\Sigma n = 2151$, Me [Q₁–Q₃]). Различие среднемедианных показателей лимфоцитов у вакцинированных и непривитых незначительно, что может быть связано в том числе и с пятикратной разницей по количеству полученных выборок. Отмечается меньший квартильный разброс полученных показателей в группе невакцинированных [14, 15, 19, 27, 33, 35, 37, 42, 44]. Распределение данных о лимфоцитах у заболевших в изученной литературе представлены на рис. 4А и 4Б, среднемедианные значения по всем указанным источникам — на рис. 4В.

Расчет данных группы невакцинированных лиц невозможно провести в связи с малым количеством (меньше пяти) значений в выборке.

Данные вакцинированных лиц распределены нормально. Статистическая значимость различий двух групп отсутствует ($p > 0,05$).

Показатель медианы моноцитов у вакцинированных равен $0,52 [0,29-1,01] \times 10^9/\text{л}$ ($\Sigma n = 160$, Ме $[Q_1-Q_3]$), у невакцинированных составляет $0,48 [0,28-0,58] \times 10^9/\text{л}$ ($\Sigma n = 235$, Ме $[Q_1-Q_3]$). Среднемедианные значения моноцитов у вакцинированных несколько выше и незначительно выходят за пределы референсных значений. Наблюдается корреляция данных с общим количеством лейкоцитов в описываемых группах [27, 35, 37, 44].

Медиана эозинофилов у вакцинированных равна $0,15 [0,00-0,56] \times 10^9/\text{л}$ ($\Sigma n = 44$, Ме $[Q_1-Q_3]$), у невакцинированных составляет $0,03 [0,00-0,04] \times 10^9/\text{л}$ ($\Sigma n = 85$, Ме $[Q_1-Q_3]$). Несмотря на малые выборки лиц, можно судить о фактическом напряжении иммунного ответа на коронавирусную инфекцию у вакцинированных лиц, поскольку эозинофилы играют немаловажную роль в противовирусном иммунитете. Однозначно можно утверждать, что значения эозинофилов в обеих группах не выходят за пределы референса [27, 37].

Заключение и выводы

Проведенный анализ позволил определить, какие показатели ОАК выходят за пределы референсных значений у вакцинированных и невакцинированных лиц. В большинстве случаев в обеих группах отмечалось сохранение значений в пределах нормы, однако стоит учитывать отличия исследуемых групп, поскольку в них включались когорты с легким, средним и тяжелым течением COVID-19. Наиболее частые отклонения от нормальных значений ОАК наблюдались в когортах тяжелых случаев заболевания. Из-за высокой частоты присоединения бактериальной инфекции во время заболевания COVID-19, особенно в случаях нахождения пациентов на аппаратах ИВЛ, сдвиг лейкоцитарной формулы приобретал нестандартные для коронавирусной инфекции значения. Такие случаи были включены в настоящее исследование и их вклад был способен изменить полученные данные.

Для объективной оценки рекомендуется провести анализ большего количества источников и составление однородных по количеству лиц, а также тяжести течения заболевания суммирующих выборок.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что общий анализ крови может отражать прогностически значимые изменения у пациентов с инфекционными заболеваниями. Так, например, выявленная лимфопения является одним из характерных изменений ОАК при

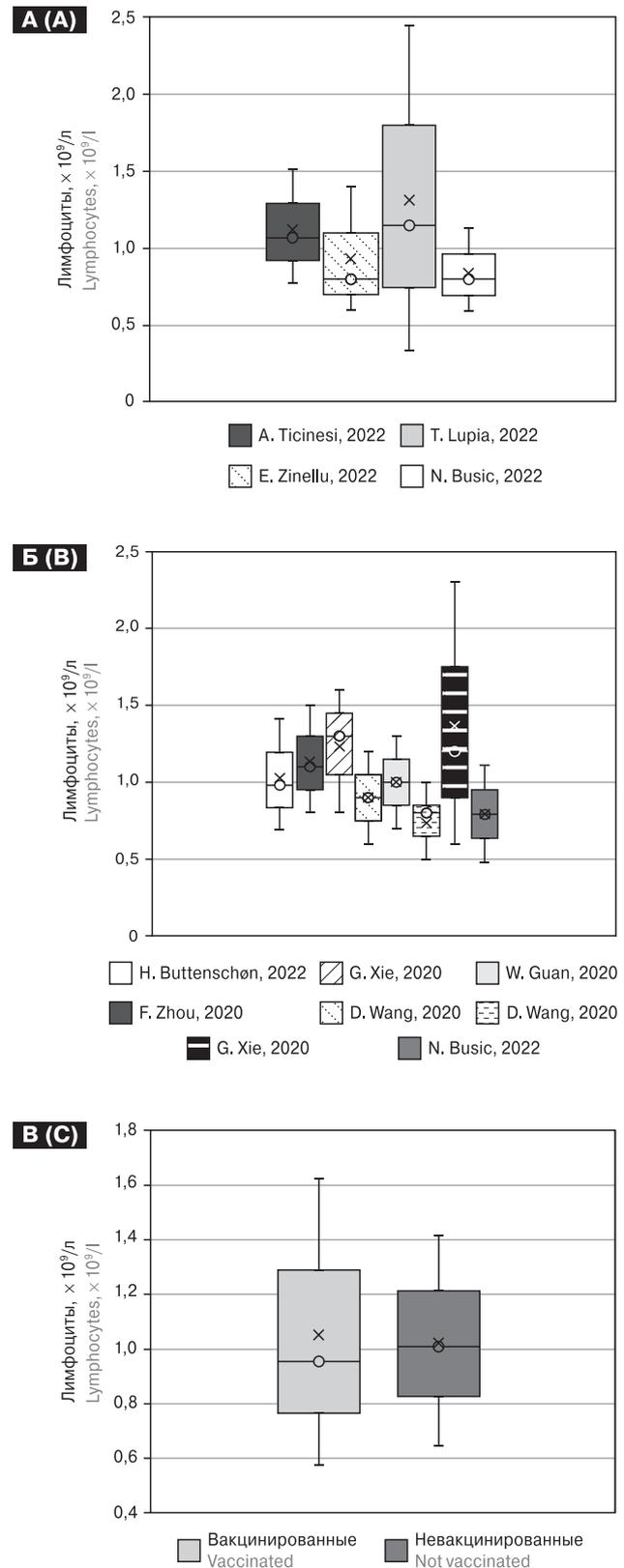


Рисунок 4. Медианные значения количества лимфоцитов у вакцинированных (А) и невакцинированных (Б) больных COVID-19 и их сравнение (В)

Figure 4. Median values of LYM in vaccinated (A) and unvaccinated (B) patients with COVID-19 and their comparison (C)

COVID-19-инфекции, что способствует формированию прогностического потенциала.

Проведение метааналитических исследований с изучением лабораторных показателей в случаях заболевания среди вакцинированных

и невакцинированных позволяет определить эффективность иммунизации различными вакцинами препаратами различных групп лиц, а также выявить определенные тенденции в динамике значений основных показателей крови.

Список литературы/References

1. Абдуллаев Р.Ю., Комиссарова О.Г. Лабораторные проявления коронавирусной инфекции COVID-19 // Врач. 2020. Т. 31, № 5. С. 3–6. [Abdulayev R.Y., Komissarova O.G. Laboratory manifestations of coronavirus infection COVID-19. *Vrach = The Doctor*, 2020, vol. 31, no. 5, pp. 3–6. (In Russ.)] doi: 10.29296/25877305-2020-05-01
2. Анаев Э.Х., Княжеская Н.П. Коагулопатия при COVID-19: фокус на антикоагулянтную терапию // Практическая пульмонология. 2020. № 1. С. 3–13. [Anaev E.Kh., Knyazheskaya N.P. Coagulopathy in COVID-19: focus on anticoagulant therapy. *Prakticheskaya pul'monologiya = Practical Pulmonology*, 2020, no. 1, pp. 3–13. (In Russ.)]
3. Бенуни Н.А., Котусов А.С., Аджиева Ф.С., Кучер А.Е., Толмачева К.А., Душук В.Н., Масленников Р.В. Вакцинация и смертность больных COVID-19: глобальный подход // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2022. Т. 32, № 3. С. 23–28. [Benuni N.A., Kotusov A.S., Adzhieva F.S., Kucher A.E., Tolmacheva K.A., Dushuk V.N., Maslennikov R.V. Vaccination and mortality of patients with a novel Coronavirus infection (COVID-19): a global approach. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2022, vol. 32, no. 3, pp. 23–28. (In Russ.)] doi: 10.22416/1382-4376-2022-32-3-23-28
4. Вечорко В.И., Евсиков Е.М., Байкова О.А., Левчук Н.Н. Характер изменения гематологических показателей у больных COVID-19 // Профилактическая медицина. 2020. Т. 23, № 8. С. 57–63. [Vechorko V.I., Evsikov E.M., Baykova O.A., Levchuk N.N. Character of changes in hematological parameters in patients with COVID-19. *Profilakticheskaya meditsina = Preventive Medicine*, 2020, vol. 23, no. 8, pp. 57–63. (In Russ.)] doi: 10.17116/profmed20202308157
5. Волчков В.А., Титова О.Н., Рукавишников С.А., Ахмедов Т.А., Пушкин А.С., Сагинбаев У.Р., Давыдова Е.П. Иммунопрофилактика COVID-19 в аспектах разных возрастных групп // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2022. Т. 66, № 2. С. 66–71. [Volchkov V., Titova O., Rukavishnikova S., Akhmedov T., Pushkin A., Saginbaev U., Davydova E. Immunoprophylaxis COVID-19 in aspects of different age groups. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya = Pathological Physiology and Experimental Therapy*, 2022, vol. 66, no. 2, pp. 66–71. (In Russ.)] doi: 10.25557/0031-2991.2022.02.66-71
6. Галстян Г.М. Коагулопатия при COVID-19 // Пульмонология. 2020. Т. 30, № 5. С. 645–657. [Galstyan G.M. Coagulopathy in COVID-19. *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2020, vol. 30, no. 5, pp. 645–657. (In Russ.)] doi: 10.18093/0869-0189-2020-30-5-645-657
7. Миронова А.А., Наркевич А.Н., Шестерня П.А. Результативность вакцинации против новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в Красноярском крае // Экология человека. 2021. № 10. С. 13–20. [Mironova A.A., Narkevich A.N., Shesternya P.A. The effectiveness of vaccination against the new coronavirus infection (Covid-19) in the Krasnoyarsk Territory. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2021, no. 10, pp. 13–20. (In Russ.)] doi: 10.33396/1728-0869-2021-10-13-20
8. Некрасова Л.А., Джайн М., Губенко Н.С., Будко А.А., Самоходская Л.М., Орлова Я.А., Камалов А.А. Возможность использования показателей клинического анализа крови в оценке воспалительного статуса пациентов с COVID-19 // Клиническая практика. 2022. Т. 13, № 1. С. 14–21. [Nekrasova L.A., Jain M., Gubenko N.S., Budko A.A., Samokhodskaya L.M., Orlova I.A., Kamalov A.A. Possibility of blood test parameters usage in the evaluation of COVID-19 patients' inflammatory status. *Klinicheskaya praktika = Journal of Clinical Practice*, 2022, vol. 13, no. 1, pp. 14–21. (In Russ.)] doi: 10.17816/clinpract80111
9. Сомова Л.М., Коцюрбий Е.А., Дробот Е.И., Ляпун И.Н., Щелканов М.Ю. Клинико-морфологические проявления дисфункции иммунной системы при новой коронавирусной инфекции COVID-19 // Клиническая и экспериментальная морфология. 2021. Т. 10, № 1. С. 11–20. [Somova L.M., Kotsyurbiy E.A., Drobot E.I., Lyapun I.N., Shchelkanov M.Yu. Clinical and morphological manifestations of immune system dysfunction in new coronavirus infection (COVID-19). *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya = Clinical and Experimental Morphology*, 2021, vol. 10, no. 1, pp. 11–20. (In Russ.)] doi: 10.31088/CEM2021.10.1.11-20
10. Сурикова Н.А., Либис Р.А. Распространенность новой коронавирусной инфекции и ее осложнений у людей с сердечно-сосудистыми факторами риска // Альманах молодой науки. 2021. № 4(43). С. 7–9. [Surykova N.A., Libis R.A. Prevalence of the new coronavirus infection and its complications in people with cardiovascular risk factors. *Al'manakh molodoi nauki = Almanac of Young Science*, 2021, no. 4(43), pp. 7–9. (In Russ.)]
11. Хрыщанович В.Я. Принципы ведения пациентов с венозной тромбозом в период пандемии COVID-19 // Новости хирургии. 2020. Т. 28, № 3. С. 329–338. [Khryshchanovich V.Ya. Management principles of patients with venous thromboembolism during the COVID-19 pandemic. *Novosti Khirurgii = Surgery News*, 2020, vol. 28, no. 3, pp. 329–338. (In Russ.)] doi: 10.18484/2305-0047.2020.3.329
12. Шестакова М.В., Мокрышева Н.Г., Дедов И.И. Сахарный диабет в условиях вирусной пандемии COVID-19: особенности течения и лечения // Сахарный диабет. 2020. Т. 23, № 2. С. 132–139. [Shestakova M.V., Mokrysheva N.G., Dedov I.I. Course and treatment of diabetes mellitus in the context of COVID-19. *Sakharnyi diabet = Diabetes Mellitus*, 2020, vol. 23, no. 2, pp. 132–139. (In Russ.)] doi: 10.14341/DM12418
13. Arentz M., Yim E., Klaff L., Lokhandwala S., Riedo F.X., Chong M., Lee M. Characteristics and outcomes of 21 critically ill patients with COVID-19 in Washington State. *JAMA*, 2020, vol. 323, no. 16, pp. 1612–1614. doi: 10.1001/jama.2020.4326
14. Busic N., Lucijanic T., Barsic B., Luksic I., Busic I., Kurdija G., Barbic L., Kunstek S., Jelic T., Lucijanic M. Vaccination provides protection from respiratory deterioration and death among hospitalized COVID-19 patients: differences between vector and mRNA vaccines. *J. Med. Virol.*, 2022, vol. 94, no. 6, pp. 2849–2854. doi: 10.1002/jmv.27666

15. Buttenschön H.N., Lynggaard V., Sandbøl S.G., Glassou E.N., Haagerup A. Comparison of the clinical presentation across two waves of COVID-19: a retrospective cohort study. *BMC Infect. Dis.*, 2022, vol. 22, no. 1: 423. doi: 10.1186/s12879-022-07413-3
16. Fan B.E., Chong V.C.L., Chan S.S.W., Lim G.H., Lim K.G.E., Tan G.B., Mucheli S.S., Kuperan P., Ong K.H. Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection. *Am. J. Hematol.*, 2020, vol. 95, no. 6, pp. E131–E134. doi: 10.1002/ajh.25774
17. Francis A.I., Ghany S., Gilkes T., Umakanthan S. Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy and geographical distributions. *Postgrad. Med. J.*, 2022, vol. 98, no. 1159, pp. 389–394. doi: 10.1136/postgradmedj-2021-140654 (25.09.2023)
18. Giraud C., Guarnieri G., Molena B., Caminati M., Stramare R., Vianello A. The lung-protective effect of prior mRNA vaccination on breakthrough COVID-19 patients receiving high flow nasal oxygen for hypoxemic acute respiratory failure. *Pulmonology*, 2023, vol. 29, no. 5, pp. 421–423. doi: 10.1016/j.pulmoe.2022.07.003
19. 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
20. Korber B., Fischer W.M., Gnanakaran S., Yoon H., Theiler J., Abfalterer W., Hengartner N., Giorgi E.E., Bhattacharya T., Foley B., Hastie K.M., Parker M.D., Partridge D.G., Evans C.M., Freeman T.M., de Silva T.I.; Sheffield COVID-19 Genomics Group; McDanal C., Perez L.G., Tang H., Moon-Walker A., Whelan S.P., LaBranche C.C., Saphire E.O., Montefiori D.C. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell*, 2020, vol. 182, no. 4, pp. 812–827.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.043
21. Kurbonova Z.Ch., Babadzhanova Sh.A., Serdal Korkmaz, Muminov O.A., Khushbokova G.U. Blood measures in patients with COVID-19. *Spectrum Journal of Innovation, Reforms and Development*, 2023, vol. 13, pp. 118–123. URL: <https://sjird.journalspark.org/index.php/sjird/article/view/588>
22. Lawton G. Your guide to the new vaccine. *New Sci.*, 2020, vol. 248, no. 3312, pp. 8–10. doi: 10.1016/S0262-4079(20)32149-7
23. Li T., Lu H., Zhang W. Clinical observation and management of COVID-19 patients. *Emerg. Microbes. Infect.*, 2020, vol. 9, no. 1, pp. 687–690. doi: 10.1080/22221751.2020.1741327
24. Li X., Xu Y., Li X., Liu W., Yao D., Chen W., Yu H., He L., Lu S., Jiang C., Zhu W., Meng L. Real-world effectiveness and protection of SARS-CoV-2 vaccine among patients hospitalized for COVID-19 in Xi'an, China, December 8, 2021, to January 20, 2022: a retrospective study. *Front. Immunol.*, 2022, vol. 13: 978977. doi: 10.3389/fimmu.2022.978977
25. Lippi G., Plebani M., Henry B.M. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: a meta-analysis. *Clin. Chim. Acta.*, 2020, vol. 506, pp. 145–148. doi: 10.1016/j.cca.2020.03.022
26. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L.; Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*, 2021, vol. 397, no. 10275, pp. 671–681. doi: 10.1016/s0140-6736(21)00234-8
27. Lupia T., Corcione S., Shbaklo N., Boglione L., Torresan S., Pinna S.M., Rizzello B., Bosio R., Fornari V., Brusa M.T., Borrè S., De Rosa F.G. Real-life experience of Molnupiravir in hospitalized patients who developed SARS-CoV2-infection: preliminary results from CORACLE registry. *Antibiotics (Basel)*, 2022, vol. 11, no. 11: 1541. doi: 10.3390/antibiotics11111541
28. Mahase E. Covid-19: Moderna applies for US and EU approval as vaccine trial reports 94.1% efficacy. *BMJ*, 2020, vol. 371: m4709. doi: 10.1136/bmj.m4709
29. 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
30. Pawlowski C., Lenehan P., Puranik A., Agarwal V., Venkatakrishnan A.J., Niesen M.J.M., O'Horo J.C., Virk A., Swift M.D., Badley A.D., Halamka J., Soundararajan V. FDA-authorized mRNA COVID-19 vaccines are effective per real-world evidence synthesized across a multi-state health system. *Med*, 2021, vol. 2, no. 8, pp. 979–992.e8. doi: 10.1016/j.medj.2021.06.007
31. Rahman S., Rahman M.M., Miah M., Begum M.N., Sarmin M., Mahfuz M., Hossain M.E., Rahman M.Z., Chisti M.J., Ahmed T., Arifeen S.E., Rahman M. COVID-19 reinfections among naturally infected and vaccinated individuals. *Sci. Rep.*, 2022, vol. 12, no. 1: 1438. doi: 10.1038/s41598-022-05325-5
32. Suzuki K., Ichikawa T., Suzuki S., Tanino Y., Kakinoki Y. Clinical characteristics of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 omicron variant compared with the delta variant: a retrospective case-control study of 318 outpatients from a single sight institute in Japan. *Peer J.*, 2022, vol. 10: e13762. doi: 10.7717/peerj.13762
33. Ticinesi A., Parise A., Cerundolo N., Nouvenne A., Prati B., Chiussi G., Guerra A., Meschi T. Multimorbidity and frailty are the key characteristics of patients hospitalized with COVID-19 breakthrough infection during Delta variant predominance in Italy: a retrospective study. *J. Clin. Med.*, 2022, vol. 11, no. 18: 5442. doi: 10.3390/jcm11185442
34. Voysey M., Clemens S.A.C., Madhi S.A., Weckx L.Y., Folegatti P.M., Aley P.K., Angus B., Baillie V.L., Barnabas S.L., Bhorat Q.E., Bibi S., Briner C., Cicconi P., Collins A.M., Colin-Jones R., Cutland C.L., Darton T.C., Dheda K., Duncan C.J.A., Emary K.R.W., Ewer K.J., Fairlie L., Faust S.N., Feng S., Ferreira D.M., Finn A., Goodman A.L., Green C.M., Green C.A., Heath P.T., Hill C., Hill H., Hirsch I., Hodgson S.H.C., Izu A., Jackson S., Jenkin D., Joe C.C.D., Kerridge S., Koen A., Kwatra G., Lazarus R., Lawrie A.M., Lelliott A., Libri V., Lillie P.J., Mallory R., Mendes A.V.A., Milan E.P., Minassian A.M., McGregor A., Morrison H., Mujadidi Y.F., Nana A., O'Reilly P.J., Padayachee S.D., Pittella A., Plested E., Pollock K.M., Ramasamy M.N., Rhead S., Schwarzbold A.V., Singh N., Smith A., Song R., Snape M.D., Sprinz E., Sutherland R.K., Tarrant R., Thomson E.C., Török M.E., Toshner M., Turner D.P.J., Vekemans J., Villafana T.L., Watson M.E.E., Williams C.J., Douglas A.D., Hill A.V.S., Lambe T., Gilbert S.C., Pollard A.J.; Oxford COVID Vaccine Trial Group. Safety and efficacy of the

- ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet*, 2021, vol. 397, no. 10269, pp. 99–111. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32661-1
35. Wang D., Hu B., Hu C., Zhu F., Liu X., Zhang J., Wang B., Xiang H., Cheng Z., Xiong Y., Zhao Y., Li Y., Wang X., Peng Z. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 2020, vol. 323, no. 11: 1113. doi: 10.1001/jama.2020.1585
 36. WHO. Status of COVID-19 vaccines within WHO EUL/PQ evaluation process. URL: https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/document_files/Status_COVID_VAX_08August2023.pdf (25.09.2023)
 37. Yang X., Yu Y., J. Xu, Shu H., Xia J., Liu H., Wu Y., Zhang L., Yu Z., Fang M., Yu T., Wang Y., Pan S., Zou X., Yuan S., Shang Y. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir. Med.*, 2020, vol. 8, no. 5, pp. 475–481. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5
 38. Xie G., Ding F., Han L., Yin D., Lu H., Zhang M. The role of peripheral blood eosinophil counts in COVID-19 patients. *Allergy*, 2021, vol. 76, no. 2, pp. 471–482. doi: 10.1111/all.14465
 39. Xu S., Huang R., Sy L.S., Glenn S.C., Ryan D.S., Morrisette K., Shay D.K., Vazquez-Benitez G., Glanz J.M., Klein N.P., McClure D., Liles E.G., Weintraub E.S., Tseng H.F., Qian L. COVID-19 vaccination and non-COVID-19 mortality risk — seven integrated health care organizations, United States, December 14, 2020 — July 31, 2021. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2021, vol. 70, no. 43, pp. 1520–1524. doi: 10.15585/mmwr.mm7043e2
 40. Young B.E., Sean-Wei X.O., Kalimuddin S., Low J.G., Tan S.Y., Loh J., Ng O.-T., Marimuthu K., Ang L.W., Mak T.M., Lau S.K., Anderson D.E., Chan K.S., Tan T.Y., Ng T.Y., Cui L., Zubaidah S., Kurupatham L., Chen M.I.-C., Chan M., Vasoo S., Wang L.F., Tan B.H., Tzer R. Lin P., Jian V., Lee M., Leo Y.-S., Lye D.C. Epidemiologic features and clinical course of patients infected with SARS-CoV-2 in Singapore. *JAMA*, 2020, vol. 323, no. 15, pp. 1488–1494. doi: 10.1001/jama.2020.3204
 41. Zawbaa H.M., Osama H., El-Gendy A., Saeed H., Harb H.S., Madney Y.M., Abdelrahman M., Mohsen M., Ali A.M.A., Nicola M., Elgendy M.O., Ibrahim I.A., Abdelrahim M.E.A. Effect of mutation and vaccination on spread, severity, and mortality of COVID-19 disease. *J. Med. Virol.*, 2022, vol. 94, no. 1, pp. 197–204. doi: 10.1002/jmv.27293
 42. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Zh., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu Sh., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult in patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 2020, vol. 395, pp. 1054–1062. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3
 43. Zhou Y., Nishikawa M., Kanno H., Yang R., Ibayashi Y., Xiao T.H., Peterson W., Herbig M., Nitta N., Miyata S., Kanthi Y., Rohde G.K., Moriya K., Yatomi Y., Goda K. Long-term effects of Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccinations on platelets. *Cytometry A*, 2023, vol. 103, no. 2, pp. 162–167. doi: 10.1002/cyto.a.24677
 44. Zinellu E., Zinellu A., Merella M., Mangoni A.A., Pau M.C., Fois S.S., Fois A.G., Carru C., Pirina P. Vaccination status and number of vaccine doses are independently associated with the PaO₂/FiO₂ ratio on admission in hospitalized COVID-19 patients. *Vaccines (Basel)*, 2022, vol. 10, no. 9: 1424. doi: 10.3390/vaccines10091424

Авторы:

Коныхов А.В., ординатор кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия; врач-эпидемиолог клиники профессиональных и профессионально-обусловленных болезней ФГБНУ НИИ институт медицины труда имени академика Н.Ф. Измерова, Москва, Россия;

Костинова А.М., ассистент кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия; научный сотрудник ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия;

Локтинова М.Н., к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия; старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологии природно-очаговых инфекций, ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Костинов М.П., заслуженный деятель науки Российской Федерации, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия; зав. лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Печеник А.С., к.м.н., доцент, врач-эпидемиолог Городской клинической больницы № 29 им. Н.Э. Баумана, Москва, Россия.

Authors:

Konyuhov A.V., Resident of the Department of Epidemiology and Modern Technologies Vaccination, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Doctor-epidemiologist, Clinic for Professional and Professionally-induced Diseases, Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, Russian Federation;

Kostinova A.M., Assistant Professor, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Researcher, Department of Immunopathology National Research Center Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation;

Loktionova M.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Senior researcher, Laboratory of Epidemiology of Natural Focal Infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

Kostinov M.P., Honored Scientist of the Russian Federation, RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Head of the Laboratory for Vaccine Prevention and Immunotherapy of Allergic Diseases, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Pechenik A.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Doctor-Epidemiologist, N.E. Bauman Clinical City Hospital No. 29, Moscow, Russian Federation.

УРОВЕНЬ АНТИТЕЛ К ШТАММАМ ВИРУСА ГРИППА У ЗДОРОВЫХ ВАКЦИНИРОВАННЫХ НА ЭТАПЕ ЗАВЕРШЕНИЯ ПАНДЕМИИ COVID-19

С.В. Юшкова¹, М.П. Костинов^{1,2}, Л.С. Гладкова^{3,6}, А.А. Камелева^{3,10}, А.С. Качнова³, А.М. Костинова^{1,3}, И.Л. Соловьева⁴, Н.П. Андреева⁵, Ю.А. Дагиль⁶, Н.Ю. Настаева⁷, Н.О. Крюкова⁸, М.Н. Локтионова^{1,2,9}

¹ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

³ ГБУЗ Городская клиническая больница им. Д.Д. Плетнева Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВПО Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск, Россия

⁵ ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия

⁶ ФГБУ Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

⁷ ФГБУЗ Новороссийский клинический центр Федерального медико-биологического агентства РФ, г. Новороссийск, Россия

⁸ ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава РФ, Москва, Россия;

⁹ ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

¹⁰ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов имени Париса Лумумбы Минобрнауки РФ, Москва, Россия

Резюме. Введение. На пик распространенности коронавирусной инфекции пришлось аномально низкие показатели выявляемости гриппа по всему миру. В сезоне 2021–2022 гг. грипп возобновил циркуляцию, а в декабре 2022 г. заболеваемость гриппом в РФ вновь достигла показателей сезона 2015–2016 г., по миру — превысила наибольшее значение, зарегистрированное в 2018 г. Существует необходимость исследования изменения картины формирования иммунитета у населения после вакцинации от гриппа в контексте влияния прошедшей пандемии COVID-19. Целью исследования было изучение уровня антител к штаммам вируса гриппа, входящим в состав вакцины, сформировавшегося на этапе завершения пандемии COVID-19 у здоровых людей. **Материалы и методы.** Всего в исследовании приняли участие 123 здоровых добровольца, которые были иммунизированы гриппозной четырехвалентной инактивированной субъединичной адьювантной вакциной, и 47 добровольцев, не иммунизированных вакциной от гриппа. Антитела к штаммам вируса гриппа определяли методом постановки реакции торможения гемагглютинации (РТГА) через месяц после введения. **Результаты.** Через 1 месяц после вакцинации отмечается значимый прирост уровня серопротекции ($p < 0,05$) в основной группе до 78,9% к штамму А/Виктория/2570/2019(H1N1)

Адрес для переписки:

Юшкова София Владимировна
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова.
Тел.: 8 (910) 458-63-94 (моб.).
E-mail: sofia-b@bk.ru

Contacts:

Sofiya V. Iushkova
105064, Russian Federation, Moscow, Malyy Kazenny lane, 5A,
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.
Phone: +7 (910) 458-63-94 (mobile).
E-mail: sofia-b@bk.ru

Для цитирования:

Юшкова С.В., Костинов М.П., Гладкова Л.С., Камелева А.А., Качнова А.С., Костинова А.М., Соловьева И.Л., Андреева Н.П., Дагиль Ю.А., Настаева Н.Ю., Крюкова Н.О., Локтионова М.Н. Уровень антител к штаммам вируса гриппа у здоровых вакцинированных на этапе завершения пандемии COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2024, Т. 14, № 1. С. 57–65. doi: 10.15789/2220-7619-LOI-17598

Citation:

Iushkova S.V., Kostinov M.P., Gladkova L.S., Kameleva A.A., Kachnova A.S., Kostinova A.M., Solovyeva I.L., Andreeva N.P., Dagil Yu.A., Nastaeva N.Yu., Kryukova N.O., Loktionova M.N. Level of influenza virus strain antibodies in healthy vaccinated people at the end of the COVID-19 pandemic // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 57–65. doi: 10.15789/2220-7619-LOI-17598

pdm09, 94,3% к штамму А/Н3N2/Дарвин/9/2021, 69,1% к штамму В/Пхукет/3073/13 и 48,8% к штамму В/Австрия/1359417/2021. Фактор сероконверсии (ФСК) к вирусам гриппа А(Н1N1), В (Виктория) и В (Ямагата) превысил необходимое минимальное значение ($p < 0,05$) и составил 4,1 (ДИ 3,68–4,54), 3,80 (ДИ 3,33–4,33) и 4,76 (ДИ 3,87–5,47) соответственно. ФСК к вирусу гриппа А(Н3N2) после вакцинации составил 2,45, что ниже требуемого уровня в 2,50 ($p < 0,05$). Уровни сероконверсии по отношению к штаммам А/Виктория/2570/2019(Н1N1)pdm09, В/Пхукет/3073/2013 и В/Австрия/1359417/2021 составили 56,1%, 50,4% и 51,2% соответственно. Уровень сероконверсии к вирусу гриппа А(Н3N2), аналогично ФСК, был минимален среди четырех штаммов ($p < 0,05$) и равнялся 38,2%. **Выводы.** Иммуногенная активность вакцины соответствовала требованиям, предъявляемым к инактивированным гриппозным сезонным вакцинам как минимум по одному критерию.

Ключевые слова: грипп, адъювантная гриппозная вакцина, иммуногенность, эффективность вакцины, безопасность, COVID-19.

LEVEL OF INFLUENZA VIRUS STRAIN ANTIBODIES IN HEALTHY VACCINATED PEOPLE AT THE END OF THE COVID-19 PANDEMIC

Iushkova S.V.^a, Kostinov M.P.^{a,b}, Gladkova L.S.^{c,f}, Kameleva A.A.^{c,i}, Kachnova A.S.^c, Kostinova A.M.^{a,c}, Solovyeva I.L.^d, Andreeva N.P.^e, Dagil Yu.A.^f, Nastaeva N.Yu.^g, Kryukova N.O.^h, Loktionova M.N.^{a,b,i}

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

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

^c D.D. Pletnev City Clinical Hospital of the Moscow City Health Department, Moscow, Russian Federation

^d Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

^e Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

^f National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

^g Novorossiysk Clinical Center of Federal Medical Biological Agency, Novorossiysk, Russian Federation

^h Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov Medical University), Moscow, Russian Federation

ⁱ Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), Moscow, Russian Federation

^j Russian University of Peoples' Friendship named after Patrice Lumumba, Moscow, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* Abnormally low global influenza detection rates were observed at the peak of ongoing COVID-19 infection. In the 2021–2022 season, influenza resumed circulation, and in December 2022 its incidence rate returned to the 2015–2016 season levels, which exceeded the highest value recorded in 2018 worldwide. There is a need to assess changes in pattern of population immunity after influenza vaccination during the global COVID-19 pandemic. The study was aimed at analyzing level of vaccine influenza virus strain antibodies in healthy people formed during the COVID-19 pandemic. *Materials and methods.* A total of 123 healthy volunteers immunized with influenza quadrivalent inactivated subunit adjuvanted vaccine and 47 unimmunized volunteers were enrolled in the study. Influenza virus strains antibodies were assessed by performing a hemagglutination inhibition (HI) test one month after vaccination. *Results.* A significantly increased seroprotection rate (SPR) ($p < 0.05$) was shown in main group that reached 78.9% against the A/Victoria/2570/2019(H1N1)pdm09 strain, 94.3% — against A/H3N2/Darwin strain /9/2021, 69.1% — against B/Phuket/3073/13 strain and 48.8% — against B/Austria/1359417/2021 strain one month after vaccination. The GMT ratio to influenza A(H1N1), B (Victoria) and B (Yamagata) viruses exceeded the required minimum value ($p < 0.05$) and comprised 4.1 (CI 3.68–4.54), 3.80 (CI 3.33–4.33) and 4.76 (CI 3.87–5.47), respectively. The post-vaccination GMT ratio to influenza A(H3N2) virus was 2.45, which is lower than the required level of 2.50 ($p < 0.05$). The seroconversion rate (SCR) for strains A/Victoria/2570/2019(H1N1)pdm09, B/Phuket/3073/2013 and B/Austria/1359417/2021 was 56.1%, 50.4% and 51.2%, respectively. The SCR of the influenza A(H3N2) virus like GMT ratio was minimal among the four strains ($p < 0.05$) and comprised 38.2%. *Conclusion.* The vaccine-related immunogenic activity met the requirements for inactivated seasonal influenza vaccines by at least one criterion.

Key words: influenza, adjuvanted influenza vaccine, immunogenicity, vaccine effectiveness, safety, COVID-19.

Введение

Грипп и ОРВИ в эпидсезоне 2022–2023 гг., также как и предыдущем сезоне 2021–2022 гг., характеризовался ранним началом эпидемического подъема. Пик заболеваемости

гриппом пришелся на декабрь 2022 г., при этом в циркуляции преобладали вирусы гриппа А(Н1N1)pdm09. В декабре 2022 г. к ним присоединились вирусы гриппа В (линия Виктория), кроме того в единичных случаях выявлялись вирусы гриппа А(Н3N2). Заболеваемость грип-

пом в 2022 г. составила 60,80 на 100 тыс. населения, что выше показателя прошлого года в 4 раза (2021 г. — 14,96 на 100 тыс. населения). В эпидемическом сезоне 2022–2023 гг. доминировал вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 подгруппы 6В.1А.5а.2, к которой отнесен вакцинный штамм А/Victoria/2570/2019(Н1N1)pdm09, рекомендованный для Северного полушария на 2022–2023 гг. Гомология исследованных вирусов с вакцинным штаммом по гену гемагглютинаина (НА) составила 97,4–98,9%. Гомология вирусов гриппа В по гену НА с вакцинным штаммом (В/Austria/1359417/2021) составила 99,1–99,6% [2].

По данным ВОЗ, вакцинация — самое эффективное медицинское вмешательство, изобретенное человеком, она ежегодно сохраняет жизнь 5 млн человек и спасает от инвалидности 750 тыс. детей [3]. Охват прививками против гриппа населения Российской Федерации в эпидемическом сезоне 2021–2022 гг. составил 47,3% (привиты 69 122 430 человек), что ниже показателя за предыдущий сезон на 19,5%. Во время подготовки к сезону гриппа 2022–2023 гг. в России было вакцинировано против гриппа 77 504 115 человек, охват прививками составил 52,8%, что выше показателя за предыдущий год на 12,2% [5].

5 мая 2023 г. ВОЗ объявила об отмене статуса чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения, связанной с пандемией COVID-19 [12]. На пик распространения коронавирусной инфекции пришлось аномально низкие показатели выявляемости гриппа по всему миру [7, 8, 9, 11]. Начиная с 2009 г., когда ВОЗ ввела систему динамического контроля за распространением вирусов гриппа, ни один сезон не имел столь низких уровней, как в 2021 г. по данным лабораторий из 86 стран. Несмотря на продолжающееся или даже увеличивающееся тестирование на грипп в некоторых странах, активность гриппозной инфекции с начала 2020 г. держалась на спорадическом уровне. В сезоне 2021–2022 гг. грипп возобновил циркуляцию, но заболеваемость составляла около $\frac{2}{3}$ от уровней 2017–2020 гг., зарегистрированных в РФ (около половины от уровней по миру). В декабре 2022 г. заболеваемость гриппом в РФ вновь достигла показателей сезона 2015–2016 г., по миру — превысила наибольшее значение, зарегистрированное в 2018 г.

В связи с распространением и циркуляцией коронавирусной инфекции появляется новое направление для изучения популяционного иммунитета к гриппу, влияния минувшей пандемии на эффективность вакцинопрофилактики гриппа. На данный момент известно, что распространенность гриппа до и во время

пандемии COVID-19 различалась. К примеру, в Китае зарегистрирован низкий уровень серопозитивных к гриппу взрослых людей после начала пандемии COVID-19, особенно в отношении А/Н1N1pdm09 и А/Н3N2, что соответствовало малому количеству лабораторно подтвержденных случаев гриппа [10]. В настоящее время остается неизученным эффективность применения квадριвалентной вакцины от гриппа в постпандемический период в Российской Федерации. Существует необходимость исследования изменения картины формирования иммунитета у населения после вакцинации от гриппа в контексте влияния прошедшей пандемии COVID-19.

Цель исследования — изучить уровень антител к штаммам вируса гриппа, входящим в состав вакцины, сформировавшийся на этапе завершения пандемии COVID-19 у здоровых людей.

Материалы и методы

Настоящее исследование проводили среди взрослых в возрасте 18–60 лет в Москве (Россия). Все участники исследования были набраны в период с октября 2022 г. по апрель 2023 г. Критерии включения: 1) возраст от 18 до 60 лет; 2) отсутствие иммунизации против гриппа в сезон 2022–2023 гг.; 3) наличие письменного добровольного информированного согласия каждого добровольца. Критерии невключения: 1) вакцинация против гриппа в сезон 2022–2023 гг.; 2) аллергические реакции на куриный белок и компоненты вакцины; 3) аллергические реакции на ранее вводимые гриппозные вакцины; 4) сильная реакция (температура выше 40°C, отек и гиперемия в месте введения свыше 8 см в диаметре) или осложнения на предыдущее введение гриппозных вакцин в анамнезе; 5) острые инфекционные или неинфекционные заболевания, обострения хронических заболеваний на момент начала проведения исследования; 6) возраст менее 18 лет или более 60 лет. Критерии исключения: 1) несоблюдение протокола исследования; 2) отказ от дальнейшего участия в исследовании.

Всего в исследовании приняли участие 123 вакцинированных участника (основная группа) и 47 добровольцев, не иммунизированных вакциной от гриппа. В группе вакцинированных насчитывалось 67 женщин (59,35%) и 56 (40,65%) мужчин. Средний возраст составил $38,0 \pm 11,5$ лет. В группе невакцинированных количество женщин составляло 36 человек (76,6%), мужчин — 11 человек (23,4%), средний возраст — $36 \pm 14,3$ года. Исследование проводилось на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский инсти-

тут вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», ГБУЗ «ГКБ им. Д.Д. Плетнева ДЗМ», ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Сбор данных и образцов крови. Исследование одобрено локальным этическим комитетом (выписка из протокола № 03-23 заседания Локального этического Комитета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Участники были набраны обученным медицинским персоналом с информированного согласия. Информация о демографических и клинических характеристиках участников, включая имя, возраст, пол и историю болезни, переносимость вакцинации, развитие респираторных инфекций была получена и записана посредством осмотра и консультаций на протяжении 6 месяцев.

Образцы венозной крови для серологического анализа собирали исходно (0-й день, до вакцинации) и через 28–40 дней после вакцинации. После центрифугирования по 3 мл сыворотки из каждого образца транспортировали в ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова и хранили при -50°C .

Вакцина против гриппа. Вакцина представляла собой гриппозную четырехвалентную инактивированную субъединичную адьювантную вакцину 2022 г. производства и была одобрена для использования Минздравом Российской Федерации. Препарат содержал по 5 мкг антигенов вирусов гриппа типа А (А/Виктория/2570/2019 (H1N1)pdm09-подобный вирус, А/Дарвин/9/2021 (H3N2)-подобный вирус), типа В (В/Пхукет/3073/2013(линия В/Ямагата)-подобный вирус, В/Австрия/1359417/2021 (линия В/Виктория)-подобный вирус) и 0,5 мг 1,4-этиленпиперазин бромида (полиоксидония) в одной дозе. До употребления препарат хранили с соблюдением температурного режима строго по инструкции. Вакцину в дозе 0,5 мл вводили внутримышечно в дельтовидную мышцу.

Оценка иммуногенности. Уровень штамм-специфических антител к ингибированию гемагглютинации измеряли с использованием стандартных анализов ингибирования гемагглютинации, которые проводили в соответствии со стандартными операционными процедурами. Антитела к штаммам вируса гриппа определяли методом постановки реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с применением диагностикумов гриппозных для торможения гемагглютинации сухие (ДИГ) А/Виктория/2570/2019 (H1N1)pdm09, А/Н3N2/Дарвин/9/2021, В/Пхукет/3073/2013, В/Австрия/1359417/2021, сыворотки диагностической гриппозной для реакции тормо-

жения гемагглютинации сухой (СДГ) А/Виктория/2570/2019(H1N1)pdm09, А/Н3N2/Дарвин/9/2021, В/Пхукет/3073/2013, В/Австрия/1359417/2021.

В качестве эталона оценки иммуногенности вакцины ориентировались на критерии эффективности вакцин, разработанные для стандартного взрослого человека, установленные Комитетом по Патентам медицинских продуктов (Committee for Proprietary Medicinal Products [CPMP]) — протокол CPMP/WWP/214/96:

– уровень серопротекции — процент привитых, у которых титр гемагглютинин-ингибирующих антител составляет более 1:40 к 21 дню после проведения вакцинации (должен быть более 70%);

– уровень сероконверсии или иммунологическая активность вакцины — относительное число привитых, у которых титр гемагглютинин-ингибирующих антител повысился более чем в 4 раза по сравнению с исходным уровнем (должен быть более 40%);

– фактор сероконверсии или средний геометрический прирост — повышение средних геометрических титров гемагглютинин-ингибирующих антител на 21 день по сравнению с исходным уровнем, выражающийся в кратности увеличения (должен быть более 2,5).

Оценка безопасности вакцин. За всеми участниками наблюдали в течение как минимум 30 мин после вакцинации для обеспечения безопасности и фиксации острых побочных проявлений после иммунизации (ПППИ). В период с 0 по 7 день проводился активный опрос участников по телефону. О ПППИ участники могли сообщать исследователям в течение 28 дней после вакцинации.

Статистический анализ. Проверка нормальности распределения признаков проводилась критерием Шапиро–Уилка. В результате были выявлены значительные отклонения распределения признаков от нормального. Описательная статистика уровня АТ представлена средним геометрическим титром и его 95% доверительным интервалом. Также было рассчитано геометрическое среднее кратное увеличение по сравнению с исходным уровнем (фактор сероконверсии) и его 95% доверительный интервал. Сравнение фактора сероконверсии между группами исследования проводилось с помощью критерия Манна–Уитни в случае несвязанных выборок. Для качественных признаков находили абсолютные и относительные (в %) частоты, для относительных показателей рассчитывался 95% доверительный интервал, рассчитанный по методу Вилсона. Сравнения двух групп по качествен-

Таблица 1. Уровень серопротекции к четырем штаммам вируса гриппа исходно и через 1 месяц после вакцинации в основной и контрольной группе

Table 1. Baseline and one-month post-vaccination seroprotection rate (SPR) for the four vaccine influenza virus strains in main and control groups

Штамм Strain	Уровень серопротекции исходно Baseline SPR		Уровень серопротекции через 1 месяц SPR after 1 month	
	Основная группа Main group	Контрольная группа Control group	Основная группа Main group	Контрольная группа Control group
H1N1	43,9% (ДИ 35,4–52,7)	42,5% (ДИ 29,5–56,7)	78,9% (ДИ 70,8–85,1)	53,2% (ДИ 39,2–66,7)
H3N2	74,8% (ДИ 66,4–81,6)	70,2% (ДИ 56,0–81,3)	94,3% (ДИ 88,7–97,2)	78,7% (ДИ 65,1–88,0)
В/Ямагата B/Yamagata	20,3% (ДИ 14,1–28,2)	14,9% (ДИ 7,4–27,7)	69,1% (ДИ 60,5–76,6)	19,1% (ДИ 10,4–32,5)
В/Виктория B/Victoria	7,3% (ДИ 3,9–13,3)	6,4% (ДИ 2,2–17,1)	48,8% (ДИ 40,1–57,5)	6,4% (ДИ 2,2–17,1)

ным номинальным показателям проводили в ходе анализа таблиц сопряженности точным критерием Фишера.

Групповые различия анализировались с использованием двустороннего t-критерия или U-критерия Манна–Уитни для непрерывных переменных и критерия Хи-квадрат или точного критерия Фишера для категориальных переменных, в зависимости от ситуации. Весь статистический анализ проводился с использованием IBM SPSS Статистика 26.0, статистическая значимость была установлена на уровне $p < 0,05$.

Результаты

Иммуногенность. Для оценки иммуногенности инактивированной квадριвалентной вакцины со штаммовым составом, обновленным на сезон 2022–2023 гг., были проанализированы парные сыворотки 123 лиц в возрасте 18–60 лет (средний возраст $38,1 \pm 13,6$ лет), привитых с ноября 2022 г. по февраль 2023 г. в Москве.

Осенью 2022 г. до проведения вакцинации уровень серопротекции лиц в основной и контрольной группах составил: к вирусам гриппа А/Виктория/2570/2019(H1N1)pdm09 — 43,9 и 42,6%; к вирусам гриппа А/Н3N2/Дарвин/9/2021 — 74,8 и 70,2%; к вирусам В/Пхукет/3073/2013 — 20,3 и 14,9%; к вирусам гриппа В/Австрия/1359417/2021 — 7,3 и 6,4% соответственно.

Через 1 месяц после вакцинации отмечается значимый прирост уровня серопротекции ($p < 0,05$) в основной группе до 78,9% к штамму А/Виктория/2570/2019(H1N1)pdm09, 94,3% к штамму А/Н3N2/Дарвин/9/2021, 69,1% к штамму В/Пхукет/3073/13 и 48,8% к штамму В/Австрия/1359417/2021 (табл. 1).

Таблица 2. Средний геометрический титр антител (СГТ) к четырем штаммам вируса гриппа исходно и через 1 месяц после вакцинации в основной группе

Table 2. Baseline and one-month post-vaccination geometric mean titer (GMT) for the four vaccine influenza virus strains in main group

Штамм Strain	СГТ антител исходно Baseline GMT	СГТ антител через 1 месяц GMT after 1 month
H1N1	25,8 (\log_2 4,69 \pm 0,36)	105,6 (\log_2 6,72 \pm 0,52)
H3N2	63,9 (\log_2 6,00 \pm 0,18)	156,7 (\log_2 7,29 \pm 0,22)
В/Ямагата B/Yamagata	12,9 (\log_2 3,69 \pm 0,4)	49,1 (\log_2 5,62 \pm 0,6)
В/Виктория B/Victoria	6,6 (\log_2 2,72 \pm 0,48)	31,4 (\log_2 4,97 \pm 0,88)

Таблица 3. Фактор сероконверсии (ФСК) к четырем штаммам вируса гриппа через 1 месяц после вакцинации в основной и контрольной группе

Table 3. Baseline and one-month post-vaccination GMT ratio for the four vaccine influenza virus strains in main and control groups

Штамм Strain	ФСК через 1 месяц после вакцинации GMT ratio 1 month after vaccination	
	Основная группа Main group	Контрольная группа Control group
H1N1	4,09 (3,68–4,54)	1,27 (1,09–1,58)
H3N2	2,45 (2,31–2,60)	1,30 (1,12–1,42)
В/Ямагата B/Yamagata	3,80 (3,33–4,33)	1,13 (0,62–1,92)
В/Виктория B/Victoria	4,76 (3,87–5,47)	0,99 (0,34–1,65)

Таблица 4. Уровень сероконверсии к четырем штаммам вируса гриппа через 1 месяц после вакцинации в основной и контрольной группе

Table 4. Baseline and one-month post-vaccination seroconversion rate (SCR) for the four vaccine influenza virus strains in main and control groups

Штамм Strain	Уровень сероконверсии через 1 месяц после вакцинации SCR after 1 month	
	Основная группа Main group	Контрольная группа Control group
H1N1	50,4% (41,7–59,1)	8,5% (3,4–19,9)
H3N2	38,2% (30,1–47,0)	10,6% (4,6–22,6)
В/Ямагата B/Yamagata	56,1% (47,3–64,6)	6,4% (2,2–17,1)
В/Виктория B/Victoria	51,2% (42,5–59,9)	2,1% (0,4–11,1)

Средний геометрический титр антител (СГТ) до вакцинации по штамму H1N1 составлял 25,8 ($\log_2 4,69 \pm 0,36$), после вакцинации — 105,6 ($\log_2 6,72 \pm 0,52$); по штамму H3N2 — 63,9 ($\log_2 6,00 \pm 0,18$) и 156,7 ($\log_2 7,29 \pm 0,22$) до и после вакцинации соответственно; по штамму В/Ямагата — 12,9 ($\log_2 3,69 \pm 0,4$) и 49,1 ($\log_2 5,62 \pm 0,6$) до и после соответственно; по штамму В/Виктория СГТ составлял 6,6 ($\log_2 2,72 \pm 0,48$), после — 31,4 ($\log_2 4,97 \pm 0,88$) (табл. 2).

Фактор сероконверсии (ФСК) к вирусам гриппа А(H1N1), В (Виктория) и В (Ямагата) превысил необходимое минимальное значение ($p < 0,05$) и составил 4,1 (ДИ 3,68–4,54), 3,80 (ДИ 3,33–4,33) и 4,76 (ДИ 3,87–5,47) соответственно (табл. 3). ФСК к вирусу гриппа А(H3N2) после вакцинации составил 2,45, что ниже требуемого уровня в 2,50 ($p < 0,05$).

Уровни сероконверсии по отношению к штаммам А/Виктория/2570/2019(H1N1)pdm09,

Таблица 5. Местные и системные поствакцинальные реакции у добровольцев в течение 28 суток наблюдения после вакцинации

Table 5. Local and systemic post-vaccination reactions in volunteers during 28 days after vaccination

Характер поствакцинальной реакции Pattern of post-vaccination reaction	Степень выраженности Intensity	Количество добровольцев, у которых были зарегистрированы поствакцинальные реакции Number of volunteers with post-vaccination reactions	
		абс.	%
Любые реакции Any reactions	Отсутствует No reactions	78	63,4
	Присутствует Any reaction	45	36,6
Местные реакции Local reactions	Отсутствует No	93	75,6
	Слабая Mild	30	24,4
	Средняя Medium	0	0
	Сильная Serious	0	0
Системные реакции Systemic reactions	Отсутствует No reactions	109	88,6
	Слабая Mild	14	11,4
	Средняя Medium	0	0
	Сильная Serious	0	0
Местные и системные реакции Local and systemic reactions		5	4,1

В/Пхукет/3073/2013 и В/Австрия/1359417/2021 составили 56,1, 50,4 и 51,2% соответственно. Уровень сероконверсии к вирусу гриппа А(Н3N2), аналогично ФСК, был минимален среди четырех штаммов ($p < 0,05$) и равнялся 38,2% (табл. 4).

Безопасность. Местные поствакцинальные реакции проявлялись в виде болезненности, покраснения и припухлости в месте введения препарата (табл. 5). Реакции слабой степени выраженности были выявлены у 30 (24,4%) привитых. Системные поствакцинальные реакции проявлялись в виде общего недомогания, ринита, миалгии, повышения температуры тела, увеличения региональных лимфоузлов, утомляемости и сонливости. Реакции слабой степени выраженности были выявлены у 14 (11,4%) привитых. Сочетание местной и общей реакции встречалось в 5 (4,1%) случаях. В 78 (63,4%) случаях переносимость вакцинации была хорошей, поствакцинальные реакции отсутствовали. В целом у 45 участников (36,6%) возникли местные и общие реакции в течение 28 дней после вакцинации.

В течение месяца не возникло никаких тяжелых поствакцинальных реакций или событий, требующих медицинского вмешательства, все реакции купировались самостоятельно в течение 1–3 дней с момента вакцинации без применения медикаментозных препаратов, либо с применением НПВС.

Обсуждение

Большая часть современных исследований посвящена иммуногенности тех или иных вакцин среди различных когорт пациентов, влиянию различных факторов на показатели поствакцинального ответа. Имеющиеся данные, свидетельствующие об иммунологической эффективности вакцинации против гриппа, подтверждаются полученными нами результатами. Обновляющийся каждый год состав вакцин против гриппа, а также различная интенсивность циркуляции штаммов является ограничивающим фактором для экстраполяции результатов настоящего исследования.

Перед проведением вакцинации против гриппа между группами вакцинированных и невакцинированных не наблюдалось различий в состоянии гуморального иммунитета — доли исходно серопозитивных лиц в группе привитых и непривитых для всех штаммов (А/Виктория/2570/2019(Н1N1)pdm09, А/Н3N2/Дарвин/9/2021, В/Пхукет/3073/13 и В/Австрия/1359417/2021) были сопоставимы.

Закономерно, что после вакцинации, проведенной в преддверии следующего эпидсезона осенью 2022 г., реакция на все новые штаммы

в группе вакцинированных значительно превышала таковую в группе непривитых лиц по трем критериям иммуногенности.

Данные, полученные в ходе нашего исследования, свидетельствуют о сниженном иммунном ответе на вирусы гриппа В по сравнению с таковым для вирусов гриппа А обоих субтипов по значениям фактора сероконверсии. По показателю уровня сероконверсии обнаружена схожая закономерность: уровень сероконверсии к гриппу А (Н3N2) равнялся 38,2% (ДИ 30,1–47,0%), что значительно меньше такового к гриппу В/Пхукет/3073/13 (ДИ 47,3–64,6%), и с большей вероятностью связано с преобладанием циркуляции вирусов гриппа А по сравнению с вирусами гриппа В. В настоящем исследовании отмечен низкий уровень серопротекции к штамму В/Виктория.

Результаты отечественных исследований иммуногенности вакцин от гриппа, проведенные с периодом с 2018 по 2022 г., свидетельствуют о вариативности показателей иммуногенности в зависимости от региона и периода.

Закономерность, описанная выше, прослеживалась также в ранее проведенных отечественных и зарубежных исследованиях: в Санкт-Петербурге среди людей 18–60 лет, вакцинированных неадъювантной трехвалентной вакциной в сезон 2019–2020 гг., все показатели иммуногенности для штамма типа В/Виктория не достигли необходимых значений [1]. Многоцентровое российское исследование среди взрослых ($n = 82$), вакцинированных от гриппа неадъювантной трехвалентной вакциной осенью 2020 г., выявило нормативный уровень сероконверсии и прирост СГТ для штаммов А(Н1N1), А(Н3N2) и В/Виктория. Показатель серопротекции оказался низок для всех четырех штаммов [4].

Индийское рандомизированное контролируемое исследование, проведенное в 2018 г. среди вакцинированных неадъювантной четырехвалентной вакциной от гриппа лиц от 18 до 60 лет, установило, что уровень сероконверсии был низким только для штамма линии В/Ямагата [6]. Эти результаты согласуются с данными настоящего исследования о сниженной иммуногенности компонентов вирусов гриппа В по сравнению с компонентами вируса гриппа А в составе инактивированных вакцин. Исходя из полученных нами данных, и в группе вакцинированных, и в группе непривитых наиболее низкий показатель серопротекции выявлен для штамма В/Австрия/1359417/2021 Викторианской линии. Вирусы, принадлежащие к Ямагатской линии, ввели в состав вакцин в 2019 г. Малая доля исходно серопозитивных лиц к гриппу В/Австрия/1359417/2021 свидетельствует о низкой активности циркуляции штаммов данной линии в течение всего периода наблюдения.

Кроме того, среди участников наблюдался низкий уровень развития поствакцинальных реакций любой степени тяжести (36,6%), при этом побочных проявлений после иммунизации средней и тяжелой степени не наблюдалось.

Заключение

Результаты этого исследования показывают, что четырехвалентная инактивированная субъ-

единичная адьювантная вакцина против гриппа была иммуногенна и хорошо переносилась участниками исследования, набранными в Москве. Иммуногенная активность вакцины, оцененная с помощью реакции торможения геммагглютинации (РТГА), при однократной внутримышечной иммунизации добровольцев 18–60 лет соответствовала требованиям, предъявляемым к инактивированным гриппозным сезонным вакцинам как минимум по одному критерию.

Список литературы/References

1. Бузицкая Ж.В., Попов А.Б., Романовская-Романько Е.А., Сергеева М.В., Варюшина Е.А., Ерофеева М.К., Стукова М.А., Лиознов Д.А. Оценка гуморального иммунного ответа у детей при иммунизации разными типами инактивированных гриппозных вакцин в сезон 2019–2020 года // Медицинская иммунология. 2023. Т. 25, № 4. С. 751–758. [Buzitskaya Zh.V., Popov A.B., Romanovskaya-Romanko E.A., Sergeeva M.V., Varyushina E.A., Erofeeva M.K., Stukova M.A., Lioznov D.A. Assessment of the humoral immune response in children after immunization with different types of inactivated influenza vaccines in the 2019–2020 season. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, vol. 25, no. 4, pp. 751–758. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-AOT-2737
2. Еженедельный бюллетень по гриппу. СПб.: ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации. [Weekly flu bulletin. St. Petersburg: Smorodintsev Research Institute of Influenza. (In Russ.)] URL: https://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics (10.01.2024)
3. Костинов М.П. Вакцинация взрослых — от стратегии к тактике. Руководство для врачей. М.: Группа МДВ, 2020. 248 с. [Kostinov M.P. Adult vaccination: from strategy to tactics. Guide for physicians. Moscow: MDV Group, 2020. 248 p. (In Russ.)]
4. Кривицкая В.З., Кузнецова Е.В., Майорова В.Г., Петрова Е.Р., Соминина А.А., Даниленко Д.М. Влияние вакцинации против гриппа на уровень специфического гуморального иммунитета здоровых лиц // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 1. С. 127–141. [Krivitskaya V.Z., Kuznecova E.V., Maiorova V.G., Petrova E.R., Sominina A.A., Danilenko D.M. Influenza vaccination influencing level of specific humoral immunity in healthy individuals. *Infektsiya i иммунитет = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 1, pp. 127–141. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-IVI-1750
5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2023. 195 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2022: State report. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 2023. 195 p. (In Russ.)]
6. Basu I., Agarwal M., Shah V., Shukla V., Naik S., Supe P.D., Srivastava M.K., Giriraja K.V., Pinjar P., Mishra P.K., Joshi S., Vijayakumar R., van de Witte S. Immunogenicity and safety of two quadrivalent influenza vaccines in healthy adult and elderly participants in India — a phase III, active-controlled, randomized clinical study. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2022, vol. 18, no. 1, pp. 1–10. doi: 10.1080/21645515.2021.1885278
7. Gomez G.B., Mahé C., Chaves S.S. Uncertain effects of the pandemic on respiratory viruses. *Science*, 2021, vol. 372, iss. 6546, pp. 1043–1044. doi: 10.1126/science.abh3986
8. Olsen S.J., Azziz-Baumgartner E., Budd A.P., Brammer L., Sullivan S., Pineda R.F., Cohen C., Fry A.M. Decreased influenza activity during the COVID-19 pandemic—United States, Australia, Chile, and South Africa, 2020. *Am. J. Transplant.*, 2020, vol. 20, no. 12, pp. 3681–3685. doi: 10.1111/ajt.16381
9. Sullivan S.G., Carlson S., Cheng A.C., Chilver M.B., Dwyer D.E., Irwin M., Kok J., Macartney K., MacLachlan J., Minney-Smith C., Smith D., Stocks N., Taylor J., Barr I.G. Where has all the influenza gone? The impact of COVID-19 on the circulation of influenza and other respiratory viruses, Australia, March to September 2020. *Euro Surveill.*, 2020, vol. 25, no. 47: pii 2001847. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.47.2001847
10. Quan C., Zhang Z., Ding G., Sun F., Zhao H., Liu Q., Ma C., Wang J., Wang L., Zhao W., He J., Wang Y., He Q., Carr M.J., Wang D., Xiao Q., Shi W. Seroprevalence of influenza viruses in Shandong, Northern China during the COVID-19 pandemic. *Front. Med.*, 2022, vol. 16, no. 6, pp. 984–990. doi: 10.1007/s11684-022-0930-5
11. WHO. Influenza laboratory surveillance information. Virus detections by subtype reported to FluNet. URL: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiZTkxODcyOTEzZjA5YS00ZmI0LWZkZGUtODIxNGI1OTE3YjM0IiwidCI6ImYyMTBjMG13LWJkMjQ0NGIzOS04MTBiLTNkYzI4MGFmYjU5MCIiImMiOiJh9> (10.01.2024)
12. WHO. Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic. 2023. URL: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic) (10.01.2024)

Авторы:

Юшкова С.В., аспирант кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации Института профессионального образования (ИПО) ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Костинов М.П., заслуженный деятель науки Российской Федерации, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия; зав. лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Гладкова Л.С., к.м.н., зам. главного врача больницы по санитарно-эпидемиологическим вопросам ГБУЗ Городская клиническая больница им. Д.Д. Плетнева Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия; доцент кафедры эпидемиологии и социальной гигиены Института медико-социальных технологий ФГБУ Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия;

Камелева А.А., к.м.н., врач аллерголог-иммунолог ГБУЗ Городская клиническая больница им. Д.Д. Плетнева Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия; ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии ФНМО МИ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов имени Париса Лумумбы Минобрнауки РФ, Москва, Россия;

Качнова А.С., врач аллерголог-иммунолог ГБУЗ Городская клиническая больница им. Д.Д. Плетнева Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия;

Костинова А.М., ассистент кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия; врач аллерголог-иммунолог ГБУЗ Городская клиническая больница им. Д.Д. Плетнева Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия;

Соловьева И.Л., д.м.н., профессор, зав. кафедрой педиатрии медицинского факультета им. Т.З. Биктимирова Института медицины, экологии и физической культуры ФГБОУ ВПО Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск, Россия;

Андреева Н.П., к.м.н., доцент кафедры организации здравоохранения и информационных технологий в медицине ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия;

Дагиль Ю.А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия;

Настаева Н.Ю., врач-эпидемиолог ФГБУЗ Новороссийский клинический центр Федерального медико-биологического агентства РФ, г. Новороссийск, Россия;

Крюкова Н.О., ассистент кафедры госпитальной терапии педиатрического факультета ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава РФ, Москва, Россия;

Локтионова М.Н., к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия; старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологии ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологии природно-очаговых инфекций ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Iushkova S.V., PhD Student, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies of Professional Education Institute, I.M. Sechenov First State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Kostinov M.P., Honored Scientist of the Russian Federation, RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Head of the Laboratory for Vaccine Prevention and Immunotherapy of Allergic Diseases, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Gladkova L.S., PhD (Medicine), Deputy Head Physician for Sanitary and Epidemiology, D.D. Pletnev City Clinical Hospital of the Moscow City Health Department, Moscow, Russian Federation; Associate Professor, Department of Epidemiology and Social Hygiene, National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation;

Kameleva A.A., PhD (Medicine), Allergist-Immunologist, Consultative and Diagnostic Department, D.D. Pletnev City Clinical Hospital of the Moscow City Health Department, Moscow, Russian Federation; Assistant Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergy, and Adaptation of the Faculty of Continuous Medical Education of the Medical Institute, Russian University of Peoples' Friendship named after Patrice Lumumba, Moscow, Russian Federation;

Kachnova A.S., Allergist-Immunologist, Consultative and Diagnostic Department, D.D. Pletnev City Clinical Hospital of the Moscow City Health Department, Moscow, Russian Federation;

Kostinova A.M., Assistant Professor, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, I.M. Sechenov First State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Allergist-Immunologist, D.D. Pletnev City Clinical Hospital of the Moscow City Health Department, Moscow, Russian Federation;

Solovyeva I.L., DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Pediatrics, faculty of medicine named after T.Z. Biktimirov Institute of Medicine, Ecology and Physical Education, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation;

Andreeva N.P., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Healthcare Organization and Information Technologies in Medicine, Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation;

Dagil Yu.A., PhD (Biology), Researcher, National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation;

Nastaeva N.Yu., Epidemiologist, Novorossiysk Clinical Center of Federal Medical Biological Agency, Novorossiysk, Russian Federation;

Kryukova N.O., Assistant Professor, Department of Hospital Therapy, Pediatrics Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov Medical University), Moscow, Russian Federation;

Loktionova M.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of Epidemiology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of Epidemiology of Natural Focal Infections, Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), Moscow, Russian Federation.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНК *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHI МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ С ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

А.С. Долгова, М.А. Капитонова, А.В. Шабалина, А.Т. Саитова, Д.Е. Полев,
М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева, В.Г. Дедков

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

Резюме. *Введение.* Наряду с применяемым для диагностики брюшного тифа методом ПЦР в реальном времени можно использовать метод петлевой изотермической амплификации (LAMP), который позволяет проводить исследование за 30–40 минут. В литературе описано несколько вариантов дизайна такой реакции для детекции *Salmonella enterica* serovar Typhi. По литературным данным эти праймеры были протестированы на штаммах, характерных для Малайзии и Китая. Мы взяли на себя труд оценить описанные выше варианты праймеров LAMP для выявления штаммов *S. Typhi* характерных для Российской Федерации и сравнить их чувствительность и специфичность между собой. *Материалы и методы.* Проведен сравнительный *in silico* анализ целевых последовательностей как по открытой базе данных NCBI, так и среди генетических последовательностей коллекционных штаммов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Протестировано несколько наборов праймеров для LAMP амплификации различных участков генома *S. Typhi*. Апробируемые праймеры амплифицируют фрагменты SalTyp1 — участок гена STY1607, SalTyp2 — участок гена STY2879, SalTyp3 — участок гена STBHUCSB_38510 шаперона ParD. *Результаты.* *In silico* анализ наборов праймеров для LAMP показал, что только набор SalTyp 3, обладает строгой специфичностью в отношении *Salmonella enterica* serovar Typhi. Для наборов SalTyp 1 и SalTyp 2 показана возможность ложноположительных реакций с некоторыми штаммами *E. coli*. Разработана методика детекции ДНК возбудителя брюшного тифа методом LAMP с флюоресцентной детекцией. В качестве молекулярной мишени был выбран фрагмент гена *Salmonella enterica* serovar Typhi STBHUCSB_38510, амплификация которого осуществлялась шестью специфическими праймерами. Аналитическая чувствительность системы составила 20 копий в реакцию, а время проведения реакции составило 35 минут. Специфичность методики была проверена на ДНК 20 изолятов *S. Typhi* и 90 штаммов других гетерологичных бактерий 24 разных видов. При этом ложноположительных и ложноотрицательных результатов не выявлено. *Заключение.* Разработанная методика может быть применена в клинической практике для лабораторного подтверждения диагноза брюшной тиф, в рамках эпидемиологического мониторинга объектов окружающей среды, а также продуктов питания.

Ключевые слова: *Salmonella enterica* serovar Typhi, LAMP, молекулярная диагностика, STBHUCSB_38510, изотермическая амплификация, брюшной тиф.

Адрес для переписки:

Долгова Анна Сергеевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (903) 242-06-14.
E-mail: dolgova@pasteurorg.ru

Contacts:

Anna S. Dolgova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (903) 242-06-14.
E-mail: dolgova@pasteurorg.ru

Для цитирования:

Долгова А.С., Капитонова М.А., Шабалина А.В., Саитова А.Т., Полев Д.Е., Макарова М.А., Кафтырева Л.А., Дедков В.Г. Идентификация ДНК *Salmonella enterica* serovar Typhi методом петлевой изотермической амплификации с флюоресцентной детекцией // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 66–76. doi: 10.15789/2220-7619-IOS-17545

Citation:

Dolgova A.S., Kapitonova M.A., Shabalina A.V., Saitova A.T., Polev D.E., Makarova M.A., Kaftyreva L.A., Dedkov V.G. Identification of salmonella enterica serovar typhi DNA by loop-mediated isothermal amplification with fluorescent detection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 66–76. doi: 10.15789/2220-7619-IOS-17545

IDENTIFICATION OF *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHI DNA BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION WITH FLUORESCENT DETECTION

Dolgoва A.S., Kapitonova M.A., Shabalina A.V., Saitova A.T., Polev D.E., Makarova M.A., Kaftyreva L.A., Dedkov V.G.

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

Abstract. Introduction. Real-time PCR may be used along with loop isothermal amplification method (LAMP) allowing to conduct the study in 30–40 minutes to diagnose typhoid fever. Several LAMP assay variations for detecting *Salmonella enterica* serovar Typhi have been described. The studies report that relevant primers were tested on strains specific for Malaysia and China. We attempted to evaluate the LAMP primers described above for identifying *S. Typhi* strains specific for the Russian Federation and compare their sensitivity and specificity with each other. **Materials and methods.** A comparative *in silico* analysis of target sequences was carried out both in the open NCBI database and among the genetic sequences of collection strains at the St. Petersburg Pasteur Institute. Several sets of primers for LAMP amplification of various *S. Typhi* genome regions were tested. The tested primers amplify the following fragments: SalTyp1 — region of the STY1607 gene, SalTyp2 — region of the STY2879 gene, SalTyp3 — region of the STBHUCCB_38510 gene of the PapD chaperone. **Results.** *In silico* analysis of LAMP primers showed that only the SalTyp 3 set has strict specificity for *Salmonella enterica* serovar Typhi. For the SalTyp 1 and SalTyp 2 an opportunity of false-positive reactions with some *E. coli* strains was shown. A LAMP method for DNA fluorescent detection of the typhoid fever causative agent was chosen. Assay has been based on a marker gene termed STBHUCCB_38510 and amplification with six specific primers. The detection limit was 20 copies/reaction in reference plasmids and the reaction time lasted for 35 minutes. The specificity of the method was tested on DNA specimens of 20 *S. Typhi* isolates and 90 strains of other heterologous bacteria from 24 different species. No false positive or false negative results were identified. **Conclusion.** The developed method can be used in clinical practice for laboratory confirmation of typhoid fever diagnosis as a part of epidemiological monitoring of environmental objects as well as food products.

Key words: *Salmonella enterica* serovar Typhi, LAMP, molecular diagnostics, STBHUCCB_38510, isothermal amplification, typhoid fever.

Введение

Брюшной тиф — тяжелая системная антропонозная инфекция, вызываемая *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), способная к широкому эпидемическому распространению. Ежегодно в мире регистрируется 21 млн новых случаев брюшного тифа и 216 000 смертей от него [19]. При этом у пациентов с брюшным тифом может наблюдаться неспецифическая клиническая картина, требующая дифференциальной лабораторной диагностики с другими лихорадочными заболеваниями, вызываемыми, например, *Salmonella Paratyphi A*, *Leptospira interrogans* и *Streptococcus pneumoniae* [12, 13], что подчеркивает важность этиологической диагностики этого заболевания. Государственная система выявления и регистрации инфекционных заболеваний в Российской Федерации позволяет отнести нашу страну к территории с низким уровнем заболеваемости брюшным тифом и низким риском инфицирования при посещении туристами. Однако за последнее десятилетие отмечен завоз брюшного тифа как минимум из 13 стран Центральной, Южной и Юго-Восточной Азии и Африки (Таджикистан, Узбекистан, Кыргызстан, Азербайджан, Абхазия, Бангладеш, Индия, Камбоджа, Пакистан, Непал, Египет, Объединенные Арабские Эмираты, Мадагаскар и др.) [8].

Оценка истинного уровня заболеваемости брюшным тифом остается сложной проблемой, решению которой мешает отсутствие во многих,

особенно развивающихся странах, современной лабораторной диагностики. Традиционно для диагностики брюшного тифа используется микробиологический метод, который считается «золотым стандартом», но требует значительных временных затрат (не менее 3–5 дней) и имеет низкую чувствительность (30–60%) [15]. Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), окончательный диагноз «брюшной тиф» должен быть подтвержден выделением бактерии *Salmonella Typhi* из крови больного. Тем не менее в ряде случаев проведение микробиологических исследований вызывает затруднения, как в связи с отсутствием необходимого микробиологического оборудования, так и в связи с отсутствием необходимых компетенций у персонала диагностической лаборатории. Как правило, в регионах с высокой заболеваемостью брюшным тифом уровень развития лабораторной диагностики находится на низком уровне. В этой связи быстрые, простые и недорогие методы специфической молекулярной диагностики *S. Typhi* могут быть востребованы в таких регионах как для лабораторного подтверждения диагноза «брюшной тиф», так и в рамках эпидемиологического мониторинга объектов окружающей среды и продуктов питания.

Для выявления *S. Typhi* разработано несколько иммунологических методов, основанных на типировании антигенов O и H, Vi, включая тест Видаля, Typhi-Dot, Tubex [5], ИХА [1] и SPR-диагностика на основе поверхностного

плазмонного резонанса [11]. Несмотря на их простоту и быстроту, чувствительность этих методов относительно низка, и оценка иммунологической реакции зависит от продукции антител и их титра, которые обычно индуцируются, по крайней мере, через неделю после инфекции *S. Typhi*, что делает невозможным раннюю диагностику с помощью этих методов. Кроме того, противоречивые результаты в отношении специфичности и чувствительности этих серологических тестов были представлены в различных эндемичных по брюшному тифу районах [15, 16, 20, 21]. В этой связи иммунологические тесты используют для выявления хронических бактерионосителей *S. Typhi*, а не больных в острой фазе. Метод SPR для обнаружения *S. Typhi* еще не прошел проверку в полевых условиях. Молекулярно-диагностические методы на основе амплификации ДНК методом ПЦР в реальном времени являются более быстрыми, специфичными и чувствительными [3, 5, 10, 14, 17]. Однако, ограничением ПЦР в реальном времени является потребность в дорогостоящем оборудовании и высококвалифицированных специалистах. Более приемлемым может оказаться метод петлевой изотермической амплификации (LAMP), который широко используется для обнаружения патогенов в клинической диагностике как быстрый, точный и экономичный метод [6, 18]. Этот метод позволяет эффективно амплифицировать ДНК (до 10^9 копий ДНК-мишени), специфически и быстро (в течение 60 минут) в изотермических условиях без явных неспецифических реакций. Реакция LAMP проста в проведении и требует только подходящих праймеров, полимеразы Bst (ДНК-полимераза с вытесняющей активностью) и водяной бани или простого термостата, что делает анализ потенциально быстрым и простым инструментом обнаружения *S. Typhi*. При необходимости детекцию можно проводить в режиме реального времени на более сложных приборах, как это принято для ПЦР. Более того LAMP позволяет проводить определение в более сжатые сроки, укладываясь менее чем в 60 минут.

На данный момент в литературе описано несколько наборов праймеров для выявления генетических маркеров *S. Typhi* в формате LAMP [2, 7, 9]. Данные наборы праймеров были протестированы на штаммах, характерных для Малайзии и Китая.

Мы взяли на себя труд оценить описанные выше варианты праймеров LAMP для выявления штаммов *S. Typhi*, характерных для Российской Федерации, и сравнить их чувствительность и специфичность между собой, а также с зарегистрированной диагностической системой на основе метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) «ДНК ОМ-Скрин-Холера/БТ-

РВ» (ЗАО «Синтол», Россия (№ РЗН 2015/2865)), с целью определения возможности применения методики LAMP в реальном времени (LAMP-РВ) для целей клинической диагностики и эпидемиологического надзора.

Материалы и методы

Характеристика штаммов. ДНК 30 штаммов *Salmonella enterica*, принадлежащих к 9 серологическим вариантам (serovar): *S. Typhi* (20 штаммов возбудителей брюшного тифа, выделенных на территории РФ), а также возбудителей сальмонеллезов *S. Enteritidis* (2 штамма EI425, EI431), *S. Typhimurium* (2 штамма EI426, EI427), *S. Newport* (1 штамм EI429), *S. Senftenberg* (1 штамм EI452), *S. Kentucky* (1 штамм EI453), *S. Kottbus* (1 штамм, EI45), *S. Muenchen* (1 штамм EI454), *S. Virchow* (1 штамм EI424), а также 80 штаммов бактерий 23 разных видов (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter kobei*, *Escherichia vulneris*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mitroreducens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas monteillii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Stenotrophomonas maltophilia*), являющихся возбудителями острых кишечных инфекций (шигеллезов или дизентерии). Остальные — возбудители ИСМП (инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи). Выделение, типирование и паспортизация штаммов (включая полногеномное секвенирование) были выполнены на базе лаборатории кишечных инфекций и Референс-центра по мониторингу за брюшным тифом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург).

Видовую идентификацию микроорганизмов проводили с использованием автоматического бактериологического анализатора «VITEK-2 Compact» (bioMérieux, Франция), а также методом матрично-ассоциированной лазерной десорбции/ионизации — времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS) с помощью системы «Microflex LT» и программного обеспечения «MALDI Biotyper v.30» (Bruker Daltonics, Германия) — значения «Score» $\geq 2,2$ были использованы в качестве критерия надежной идентификации. Антигенную характеристику штаммов *Salmonella* spp. изучали согласно действующим методическим указаниям МУ 4.2.2723-10 «Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды» с диагностическими адсорбированными поливалентными и моновалентными

ми О- и Н-сыворотками (ФГУП СПбНИИВС «ПЕТСАЛ», ЗАО «ЭКОлаб», Россия).

In silico анализ. Анализ уникальности целевых последовательностей, детектируемых тремя рассматриваемыми методиками на основе LAMP, проводили методом выравнивания и поиска гомологичных участков в программе BLAST.

Поиск гомологий был проведен как среди генетических последовательностей штаммов, собранных на территории РФ, представленных в коллекции Референс-центра по мониторингу за брюшным тифом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, так и представленных в международной генетической базе NCBI.

LAMP-PB. Были апробированы 3 набора праймеров, структура которых была опубликована ранее. Апробируемые праймеры амплифицируют фрагменты SalTyp1 — участок гена STY1607 [2], SalTyp2 — участок гена STY2879 [7], SalTyp3 — участок гена STVHUCSB_38510 шаперона ParD [9]. Праймеры и детектируемые ими

последовательности представлены в табл. 1. Амплификацию проводили в реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл 2-кратной смеси «БиоМастер LAMP SYBR Green» (Biolabmix, Новосибирск, Россия), в состав которой входит Bst полимеразы, 40 пмоль FIP и BIP праймеров, 5 пмоль F3 и B3 праймеров, 20 пмоль LF и LB (в SalTyp2 два последних праймера отсутствовали), 1 мкл ДНК. Объем реакционной смеси доводили до 25 мкл H₂O (milliQ, Simplicity, Millipore, США). Приготовление реакционной смеси осуществляли в охлаждающем штативе. Реакцию проводили в амплификаторе «CFX96 Touch 100» (Bio-Rad, Hercules, США) при 63°C 35 мин. Флуоресцентный сигнал детектировали с шагом в 1 мин на канале FAM. В качестве отрицательного контроля LAMP использовали H₂O (milliQ, Simplicity, Millipore, США).

Положительные контрольные образцы LAMP-PB. В качестве положительных контрольных образцов были сконструированы плазмиды на основе детектируемых последо-

Таблица 1. Последовательности детектируемых участков генов *S. Typhi* и праймеров для проведения LAMP

Table 1. Sequences of target *S. Typhi* gene regions and primers for LAMP

SalTyp1	Последовательности участка детектируемого гена <i>Salmonella Typhi</i> и олигонуклеотидов (3'-5') Sequences of target <i>Salmonella Typhi</i> gene region and oligonucleotides (3'-5')
STY1607	GACTTGCCTTTAAAAGATACCAGAGCCCGAATGACTCGACCATCAGGAACGAAGCCATCCGATAACTCCAAC TCTTCAGCAGCAAGTTTACCAGATACTCCTCGGGAGCCTGGGGCCAAATGGCATTAAACAAGGGTTTCAAGA CTAAGTGGTTCACCAGCCTTACTTAGTGCATGTAAGTGTTCAAACGCACTCT
SalTyp1 F3	GACTTGCCTTTAAAAGATACCA
SalTyp1 B3	AGAGTGCCTTTGAACACTT
SalTyp1 FIP (F1c-F2)	AACTTGCTGCTGAAGAGTTGGA-CCGAATGACTCGACCATC
SalTyp1 BIP (B1c-B2)	CCTGGGGCCAAATGGCATTG-TGCACTAAGTAAGGCTGG
SalTyp1 Loop F (LF)	TCGGATGGCTTCGTTCT
SalTyp1 Loop B (LB)	CAAGGGTTTCAAGACTAAGTGGTTC
SalTyp2	Последовательности участка детектируемого гена <i>Salmonella Typhi</i> и олигонуклеотидов (3'-5') Sequences of target <i>Salmonella Typhi</i> gene region and oligonucleotides (3'-5')
STY2879	GCCAAATTGTTTGACGAGATGATCACATCATCCATACACACACTTAGCTTGAGATCATGATGTTTGTTCATCG GCGTAGTAAGCTACCAAAATAACTTTTATCTAAGCAGAGGGTTGCAAGTATTGGAGATTGAACAAAACCAAAA GGGAGGACATGCTTATGTGGACTATGGGACAAGTTTCTTACAG
SalTyp2 F3	GCCAAATTGTTTGACGAGA
SalTyp2 B3	CTGTAAGAACTTGTCCCATAG
SalTyp2 FIP (F1c-F2)	TACTACGCCGATTGAACAAACAT TGATCACATCATCCATAAACACA
SalTyp2 BIP (B1c-B2)	CTAAGCAGAGGGTTGCAAGTATT CCACATAAGCATGTCCTCC
SalTyp3	Последовательности участка детектируемого гена <i>Salmonella Typhi</i> и олигонуклеотидов (3'-5') Sequences of target <i>Salmonella Typhi</i> gene region and oligonucleotides (3'-5')
STVHUCSB_38510	TCTGGCACTCCTGTGCCTTAATCTTCCCTCTGCTTTTGCAGGTATTGTGGTGGTGGAACTCGCGTCATTTTT CATGGCAACGATCCTGACTCTACTATTTCTATTTACAATAAAGAAGTTGATTTGCCCTTATCTAATACAAGTATGG GTTGATCCTTTCAGTAAGGATGATAAGAGCAAACCACCTTTTACCGTCATCCGCTGTTTCTCGTCTTGAGC
SalTyp3 F3	CTGGCACTCCTGTGCCTT
SalTyp3 B3	GCTCAAGACGAGAAACAGG
SalTyp3 FIP (F1c-F2)	TAGAAATAGTAGAGTCAGG TTTTT GCTTTTGCAGGTATTGTGG
SalTyp3 BIP (B1c-B2)	TTGCCCTTATCTAATACAAGT TTTTGATAAAGGTGGTTTGTCTCT
SalTyp3 Loop F (LF)	ATGAAAAATGACGCGAGTT
SalTyp3 Loop B (LB)	GTTGATCCTTTCAGTAAGG

вательностей, представленных в табл. 1. С помощью ПЦР были получены соответствующие рекомбинантные фрагменты ДНК, которые далее были клонированы в плазмиду «pGEM®-T Easy» (Promega, Madison, США), содержащую ген ампициллиновой устойчивости — β -лактамазу. Плазмиды были трансформированы в *Escherichia coli* (Turbo cells) (New England BioLabs, Великобритания). Рекомбинантные плазмиды были очищены с помощью набора «Plasmid Miniprep kit» (Zymo Research, США) и исследованы на наличие мутаций в клонированных ПЦР фрагментах с помощью прибора для автоматического капиллярного секвенирования «ABI-Prism 3100 XL» (Applied Biosystems, США). Были отобраны плазмиды с отсутствием мутаций в области посадки праймеров для проведения реакции LAMP.

Аналитическая чувствительность. Аналитическую чувствительность определяли методом серийных разведений. С этой целью концентрации рекомбинантных плазмид были измерены с помощью спектрофотометра «NanoDrop OneC» (Thermo Scientific, США). На основании данных спектрофотометрии были рассчитаны концентрации в копиях/мл с использованием программы SciencePrimer (<http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>) и сделаны серии разведений 10^7 –100 копий/мкл для каждой рекомбинантной плазмиды pGEM-SalTyp1, pGEM-SalTyp2 и pGEM-SalTyp3. Для вариантов pGEM-SalTyp1 и pGEM-SalTyp3 были сделаны также дополнительные разведения для определения порога чувствительности, составляющие 80, 60, 40, 30 и 20 копий/мкл.

Аналитическая специфичность. Аналитическую специфичность изучали с помощью панели образцов ДНК, из штаммов *S. Typhi*, выделенных в разные годы в разных регионах Российской Федерации, а также ДНК других бактерий, вызывающих заболевания кишечника и внутрибольничные инфекции.

Сравнение методик LAMP-PB и ПЦР-PB. Сравнительные исследования разработанной методики LAMP-PB и метода ПЦР-PB проводили с помощью набора реагентов для выявления *S. Typhi* методом ПЦР в реальном времени «ДНК ОМ-Скрин-Холера/БТ-PB» (ЗАО «Синтол», Россия (№ РЗН 2015/2865), используемого в качестве мишени участок локуса STY3672 *S. Typhi*. Для проведения сравнительного исследования параллельно тестировали панель охарактеризованных образцов ДНК из штаммов *S. Typhi*, а также других бактерий, вызывающих заболевания кишечника и внутрибольничные инфекции.

Результаты

In silico анализ. Для целевой последовательности *S. Typhi*, детектируемой набором праймеров SalTyp1 выявлены гомологи среди ряда штаммов *E. coli*: штамм 90-9133 (CP042947.1), штамм F16EC0617 (CP088374.1), штамм M-17 (CP068394.1), штамм H1998 (CP121347.1), штамм DLI.5a (CP103972.1), O78 штамм 3 (CP084096.1), штамм RIVM_C036569 (CP086627.1), штамм 18SC05VL02-EC (CP063736.1), штамм RHB30-C16 (CP057287.1), штамм RHB30-C17 (CP057281.1), штамм RHB30-C19 (CP055669.1), штамм RHB30-C20 (CP055945.1), штамм RHB14-C15 (CP057812.1), штамм RHB14-C22 (CP057796.1), штамм CE0011 (CP119008.1), изолят L4_E1441_ETEC (LR883012.1) (рис. 1А). Также обнаружена гомология с генетической последовательностью бактериофага *Caudoviricetes* sp., изолят cteTN1 (BK021514.1). Для целевой последовательности *S. Typhi*, детектируемой набором праймеров SalTyp2, выявлены гомологи среди штаммов *E. coli* штамм Z0117EC0133 (CP098183.1), штамм JL05 (CP049936.1) и штамм EcPNK004 (CP071439.1) (рис. 1Б). Для целевой последовательности *S. Typhi*, детектируемой набором праймеров SalTyp3, совпадений с известными штаммами других микроорганизмов не выявлено.

Кроме того, был произведен поиск гомологий среди генетических последовательностей коллекционных штаммов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Для целевой последовательности *S. Typhi*, детектируемой набором праймеров SalTyp1 выявлен фрагмент с высокой степенью гомологии в генетической последовательности штамма *E. coli* EI0304, который содержал 202 идентичных нуклеотидных остатка, однако не перекрывался праймером F3 (рис. 1А). Для целевой последовательности *S. Typhi*, детектируемой набором праймеров SalTyp2, был выявлен практически полностью гомологичный фрагмент в генетической последовательности штамма *E. coli* EI0386 (рис. 1Б). Отличия заключались в одном нуклеотиде на 5'- и 3'-концах соответственно. Такие незначительные отличия, очевидно, могут приводить к возникновению ложноположительной реакции.

Для целевой последовательности *S. Typhi*, детектируемой набором праймеров SalTyp3, был выявлен гомологичный фрагмент в генетической последовательности штамма *Escherichia coli* EI0274, содержащий идентичные 175 из 221 нуклеотидов целевой последовательности (рис. 1В). Однако он не перекрывался праймером В3, что позволило предположить отсутствие кросс-реакции с этим штаммом.

Аналитическая чувствительность. Для набора праймеров SalTyp2 аналитическая чувствительность составила 10^6 копий в реакцию, в то время как для наборов SalTyp1 и SalTyp3 порог аналитической чувствительности составил 20 копий в реакцию (рис. 2).

Результаты наших исследований показали, что увеличение времени реакции с 35 до 60 минут не влияет на чувствительность. Все положительные образцы детектируются до 30 минуты. Таким образом, анализ методом LAMP-РВ занимает чуть более получаса.

Сравнение методик LAMP-РВ и ПЦР-РВ. Анализ характеристик методики LAMP-РВ на осно-

ве набора праймеров SalTyp3 показал отсутствие ложноположительных результатов при тестировании ДНК штаммов гетерологичных бактерий (90 образцов 24 видов) сформированной панели. При этом все образцы ДНК штаммов *S. Typhi* детектировались как положительные (табл. 2). Для штамма *Escherichia coli* EI0274, в котором при *in silico* анализе был выявлен фрагмент с частичной гомологией к целевому участку гена STVHUCSB_38510, было подтверждено отсутствие неспецифического сигнала.

В то же время при скрининге панели набором реагентов ОМ-Скрин-Холера/БТ-РВ (ЗАО «Синтол») выявлено восемь ложноположитель-

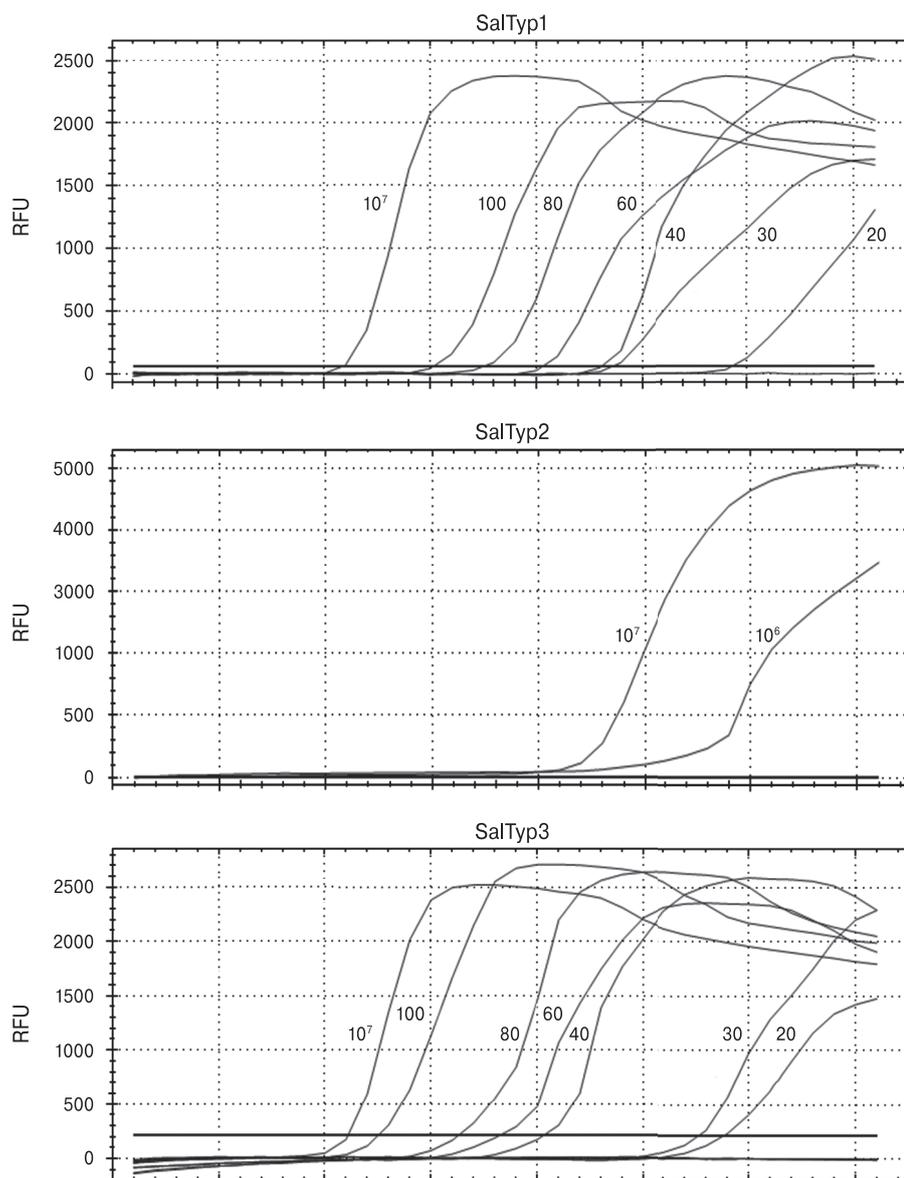


Рисунок 2. Детекция флуоресцентного сигнала реакции LAMP-РВ на приборе «CFX96 1000 Touch» для определения аналитической чувствительности

Figure 2. Detection of LAMP-RT fluorescent signal on the “CFX96 1000 Touch” to determine analytical sensitivity

Примечание. Ось Y — относительные единицы флуоресценции (RFU), ось X — минуты. Разведения в копиях в реакцию показаны для каждого варианта праймеров.

Note. Y axis — relative fluorescence units (RFU), X axis — minutes. Copy dilutions per reaction are shown for each primer variant.

Таблица 2. Сравнение методик LAMP-РВ на основе сета праймеров SalTyp 3 и ПЦР-РВ (ОМ-Скрин-Холера/БТ-РВ (ЗАО «Синтол»))

Table 2. Comparison of LAMP-RT method based on the SalTyp 3 primer set and RT-PCR (OM-Screen-Cholera/BT-RT (JSC Synthol))

Вид Species	Штамм Strain	LAMP, мин LAMP, min	PCR, Ct PCR, Ct	Вид Species	Штамм Strain	LAMP, мин LAMP, min	PCR, Ct PCR, Ct	Вид Species	Штамм Strain	LAMP, мин LAMP, min	PCR, Ct PCR, Ct
<i>A. baumannii</i>	16-60	-	-	<i>E. coli</i>	14-1009	-	-	<i>S. enterica</i>	16-465	-	-
<i>A. pittii</i>	19-2	-	-		20-226	-	-		18-504	-	-
	16-93	-	-		20-227	-	-		19-235	-	-
<i>C. braakii</i>	14-488	-	-		20-238	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Enteritidis	EI425	-	-
	14-494	-	-		20-239	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Kentucky	EI431	-	-
	14-579	-	-		20-240	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Kottbus	EI453	-	-
	16-119	-	-		20-241	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Muenchen	EI455	-	-
<i>C. diversus</i>	14-64	-	-		16-48	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Newport	EI454	-	-
<i>C. freundii</i>	19-245	-	-		15-158	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Senftenberg	EI429	-	-
	15-1097	-	-		22-574	-	-	EI332	6,8	21,1	
<i>C. koseri</i>	14-78	-	-		22-575	-	-	EI333	6,4	20,9	
<i>E. asburiae</i>	14-575	-	-		22-576	-	-	EI334	6,5	20,4	
<i>E. cloacae</i>	14-75	-	-		22-577	-	-	EI335	6,3	20,3	
	14-92	-	-		22-578	-	-	EI336	6,7	20,5	
	14-478	-	-		20-251	-	-	EI337	6,4	21	
	14-591	-	-		20-253	-	-	EI338	6,8	20,3	
<i>E. coli</i>	4-3	-	27,2		20-254	-	-	EI339	6,3	20,3	
	4-6	-	26,5		<i>E. kobei</i>	14-572	-	-	EI340	7,0	27,7
	4-8	-	26,6		<i>E. vulneris</i>	15-233	-	-	EI341	6,5	24,3
	4-9	-	28,7		<i>H. alvei</i>	14-555	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Typhi	EI342	6,6
	4-13	-	29,0	16-278		-	-	EI343	6,4	23,2	
	4-15	-	27,7	<i>K. oxytoca</i>	14-551	-	-	EI344	6,3	22,3	
	30316/23	-	26,2		14-554	-	-	EI345	6,4	31,2	
	EI274	-	-		14-592	-	-	EI346	6,7	21,1	
	72/1	-	-	<i>K. pneumoniae</i>	17-508	-	-	EI347	6,3	21,3	
	72/2	-	-		17-532	-	-	EI348	6,4	25,1	
	19-119	-	-		14-559	-	-	EI349	6,1	22,6	
	14-640	-	-		14-558	-	-	EI131	7,1	31,1	
	20-228	-	-	<i>P. aeruginosa</i>	16-77	-	-	EI132	6,4	28	
	14-860	-	-		14-576	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium	EI426	-	-
	14-666	-	-		16-61	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Virchow	EI427	-	-
	14-432	-	-	<i>P. mirabilis</i>	17-133	-	-	EI424	-	38,4	
	20-229	-	-		17-151	-	-	18-275	-	-	
	22-5	-	-		14-102	-	-	19-374	-	-	
	20-230	-	-		17-147	-	-	19-375	-	-	
	20-231	-	-		17-117	-	-	16-116	-	-	
	14-831	-	-	<i>P. mitroreducens</i>	14-581	-	-	14-515	-	-	
	14-848	-	-	<i>P. monteillii</i>	14-591	-	-	16-190	-	-	
	14-477	-	-	<i>P. putida</i>	14-574	-	-	19-135	-	-	
	15-1153	-	-	<i>P. vulgaris</i>	14-582	-	-	19-140	-	-	
	16-292	-	-	<i>S. enterica</i>	22-4	-	-	18-670	-	-	
	15-681	-	-		18-488	-	-	K+	5,4	31,6	
	14-549	-	-		22-9	-	-	K-	-	-	
	14-788	-	-		16-401	-	-				

Примечание. Численные значения в случае положительной реакции представлены минутами для LAMP-РВ и пороговыми циклами (Ct) для ПЦР-РВ.
Note. Numerical values for positive reaction are presented in minutes for LAMP-RT and threshold cycles (Ct) for PCR-RT.

ных результатов (семь образцов ДНК штаммов *E. coli* и один образец ДНК из штамма *S. enterica* serovar Virchow были детектированы как позитивные. При этом все образцы штаммов *S. Typhi* также детектировались как положительные (табл. 2).

Обсуждение

In silico анализ наборов праймеров для LAMP показал, что только набор SalTyp3 обладает строгой специфичностью в отношении *Salmonella enterica* serovar Typhi. Для наборов SalTyp 1 и SalTyp 2 показана возможность ложноположительных реакций с некоторыми штаммами *E. coli*, что, вероятно, обусловлено межвидовым дрейфом генов STY1607 и STY2879 вследствие пластичности генома бактерий группы кишечных инфекций. Данное предположение подкреплено тестированием различных наборов праймеров для LAMP на панели ДНК из гомологичных (штаммы *S. Typhi*) и гетерологичных штаммов бактерий 27 видов. При этом только для набора SalTyp 3 показано отсутствие ложноположительных реакций, что позволяет нам рекомендовать именно этот вариант праймеров для детекции *S. Typhi*. Высокая специфичность варианта праймеров SalTyp 3 вероятно обусловлена выбором в качестве мишени фрагмента гена STVHUCSB_38510, менее склонного к межвидовому генетическому дрейфу. Тем не менее полностью исключить вероятность такого переноса невозможно, что требует дальнейшего изучения.

На основе структуры трех наборов праймеров для выявления ДНК *S. Typhi* нами была разработана методика LAMP с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I, позволяющего проводить учет результатов в реальном времени с использованием стандартного оборудования для ПЦР-РВ. При этом в качестве реагентов для проведения LAMP-РВ нами был использован набор «БиоМастер LAMP SYBR Green I» (Biolabmix, Новосибирск, Россия), содержащий Bst-полимеразу. Для оценки аналитической чувствительности были сконструированы рекомбинантные контрольные образцы, содержащие соответствующие каждому набору праймеров фрагменты детектируемых генов *S. Typhi*.

Измеренная с помощью этих образцов чувствительность методики LAMP-РВ в нашей модификации составила 10^6 копий в реакцию (10^9 копий/мл в исходном образце) для набора праймеров SalTyp2 и 20 копий в реакцию для наборов SalTyp1 и SalTyp3 (2×10^4 копий/мл в исходном образце). При этом время проведения реакции составило 35 мин. Аналитическая чувствительность для наборов праймеров SalTyp1 и SalTyp3 согласуется с литературными данными [7], в которых аналитическая чувствительность, измеренная сходным способом, составляет 15 копий в реакцию. Для варианта SalTyp2 чувствительность оказалась существенно ниже приведенной в литературе [7], что вероятно связано с неоптимальным для данного набора праймеров составом коммерческой реакционной смеси.

Сравнительным тестированием LAMP-РВ с вариантом праймеров SalTyp3 и набора реагентов «ОМ-Скрин-Холера/БТ-РВ» на основе метода ПЦР в реальном времени показано, что обе методики позволяют выявлять все образцы ДНК из штаммов *S. Typhi*, актуальных для России. При этом набор реагентов «ОМ-Скрин-Холера/БТ-РВ» имеет, по данным разработчиков, большую аналитическую чувствительность (10^3 копий/мл исходного образца). Однако 8 образцов ДНК из гетерологичных штаммов данным набором были детектированы как положительные. При этом 7 образцов являлись ДНК из штаммов *E. coli*, а 1 — ДНК из штамма *Salmonella enterica* serovar Virchow. Таким образом можно заключить, что данные штаммы и *Salmonella enterica* serovar Typhi имеют в своем геноме ряд общих гомологичных последовательностей, наличие которых приводит к появлению ложноположительных результатов, а выбор разработчиками набора в качестве мишени фрагмента гена STY3672 *S. Typhi* не является оптимальным.

Брюшной тиф является социально опасным заболеванием, характеризующимся фекально-оральным механизмом передачи.

Для успешного эпидемиологического контроля за циркуляцией *S. Typhi*, помимо диагностики брюшного тифа или его хронического носительства у людей, необходим и мониторинг объектов окружающей среды (сточные воды, пищевые продукты и т.д.). В этой связи наличие современных средств молекулярной диагностики, позволяющих оперативно выявлять ДНК *S. Typhi*, может

Таблица 3. Характеристики методов LAMP и ПЦР в реальном времени при 95% доверительном интервале (CI)

Table 3. Characteristics of LAMP and real-time PCR methods with 95% confidence interval (CI)

Методика Method	Чувствительность, % Sensitivity, %	95% ДИ 95% CI	Специфичность, % Specificity, %	95% ДИ 95% CI
LAMP	100	83,2–100	100	96,7–100
PCR	100	83,2–100	92,7	86,2–96,8

существенно облегчить поставленную задачу. Наше исследование показало, что метод LAMP-РВ, равно как и метод ПЦР-РВ, обладают приемлемой аналитической чувствительностью и могут быть использованы для подобных исследований. Следует отметить, однако, что выявление *S. Typhi* требует проведения комплекса оперативных противоэпидемических мероприятий. Поэтому кросс-реактивность молекулярных диагностикомов для выявления генетических маркеров *S. Typhi* (особенно в отношении гетерологичных микроорганизмов «кишечной группы») может приводить к нежелательным социально-экономическим последствиям. С целью исключения ложноположительных результатов целесообразно

одновременное применение не менее двух молекулярных диагностикомов, детектирующих фрагменты различных генов *S. Typhi*. Наличие же феномена горизонтального межвидового переноса генов между бактериями «кишечной группы» требует проведения постоянного генетического мониторинга возбудителей острых кишечных инфекций и регулярной актуализации структуры праймеров в используемых средствах молекулярной диагностики.

Благодарности

Работа выполнена в рамках реализации Федерального проекта «Санитарный щит».

Список литературы/References

1. Abdullah J., Saffie N., Sjasri F.A., Husin A., Abdul-Rahman Z., Ismail A., Aziah I., Mohamed M. Rapid detection of Salmonella Typhi by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Braz. J. Microbiol.*, 2015, vol. 45, no. 4, pp. 1385–1391. doi: 10.1590/s1517-83822014000400032
2. Ali A., Haque A., Haque A., Sarwar Y., Mohsin M., Bashir S., Tariq A. Multiplex PCR for differential diagnosis of emerging typhoidal pathogens directly from blood samples. *Epidemiol. Infect.*, 2009, vol. 137, no. 1, pp. 102–107. doi: 10.1017/S0950268808000654
3. Ali K., Zeenab A., Zahra S., Akbar K., Saeid M. Development of an ultra rapid and simple multiplex polymerase chain reaction technique for detection of Salmonella typhi. *Saudi Med. J.*, 2006, vol. 27, no. 8, pp. 1134–1138.
4. Ambati S.R., Nath G., Das B.K. Diagnosis of typhoid fever by polymerase chain reaction. *Indian J. Pediatr.*, 2007, vol. 74, no. 10, pp. 909–913. doi: 10.1007/s12098-007-0167-y
5. Bhutta Z.A. Current concepts in the diagnosis and treatment of typhoid fever. *BMJ*, 2006, vol. 333, no. 7558, pp. 78–82. doi: 10.1136/bmj.333.7558.78
6. Crump J.A., Mintz E.D. Global trends in typhoid and paratyphoid fever. *Clin. Infect. Dis.*, 2010, vol. 50, no. 2, pp. 241–246. doi: 10.1086/649541
7. Dong B., Galindo C.M., Shin E., Acosta C.J., Page A.L., Wang M., Kim D., Ochiai R.L., Park J., Ali M., Seidlein L.V., Xu Z., Yang J., Clemens J.D. Optimizing typhoid fever case definitions by combining serological tests in a large population study in Hechi City, China. *Epidemiol. Infect.*, 2007, vol. 135, no. 6, pp. 1014–1020. doi: 10.1017/S0950268806007801
8. Егорова С.А., Кулешов К.В., Кафтырева Л.А., Матвеева З.Н. Чувствительность к антибиотикам, механизмы резистентности и филогенетическая структура популяции *S. typhi*, выделенных в 2005–2018 гг. в Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 99–110. [Egorova S.A., Kuleshov K.V., Kaftyreva L.A., Matveeva Z.N. The antimicrobial susceptibility, resistance mechanisms and phylogenetic structure of *S. typhi* isolated in 2005–2018 in the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 99–110. (In Russ.)] doi: 10.15789/10.15789/2220-7619-ASM-1171
9. Fan F., Du P., Kan B., Yan M. The development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of Salmonella enterica serovar Typhi. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 4: e0124507. doi: 10.1371/journal.pone.0124507
10. Fan F., Yan M., Du P., Chen C., Kan B. Rapid and sensitive salmonella typhi detection in blood and fecal samples using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2015, vol. 12, no. 9, pp. 778–786. doi: 10.1089/fpd.2015.1950
11. Francois P., Tangomo M., Hibbs J., Bonetti E.J., Boehme C.C., Notomi T., Perkins M.D., Schrenzel J. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2011, vol. 62, no. 1, pp. 41–48. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x
12. Kawano R.L., Leano S.A., Agdamag D.M. Comparison of serological test kits for diagnosis of typhoid fever in the Philippines. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, vol. 45, no. 1, pp. 246–247. doi: 10.1128/JCM.01403-06
13. Levy H., Diallo S., Tennant S.M., Livio S., Sow S.O., Tapia M., Fields P.I., Mikoleit M., Tamboura B., Kotloff K.L., Lagos R., Nataro J.P., Galen J.E., Levine M.M. PCR method to identify Salmonella enterica serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B among Salmonella isolates from the blood of patients with clinical enteric fever. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, vol. 46, no. 5, pp. 1861–1866. doi: 10.1128/JCM.00109-08
14. Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 2004, vol. 59, no. 2, pp. 145–157. doi: 10.1016/j.jbbm.2003.12.005
15. Murdoch D.R., Woods C.W., Zimmerman M.D., Dull P.M., Belbase R.H., Keenan A.J., Scott R.M., Basnyat B., Archibald L.K., Reller L.B. The etiology of febrile illness in adults presenting to Patan hospital in Kathmandu, Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2004, vol. 70, no. 6, pp. 670–675. doi: 10.4269/ajtmh.2004.70.670
16. Naheed A., Ram P.K., Brooks W.A., Mintz E.D., Hossain M.A., Parsons M.M., Luby S.P., Breiman R.F. Clinical value of Tubex and Typhidot rapid diagnostic tests for typhoid fever in an urban community clinic in Bangladesh. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2008, vol. 61, no. 4, pp. 381–386. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.03.018
17. Nakhla I., El Mohammady H., Mansour A., Klena J.D., Hassan K., Sultan Y., Pastoor R., Abdoel T.H., Smits H. Validation of the Dri-Dot Latex agglutination and IgM lateral flow assays for the diagnosis of typhoid fever in an Egyptian population. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2011, vol. 70, no. 4, pp. 435–441. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.03.020
18. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 2000, vol. 28, no. 12: E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63

19. Olsen S.J., Pruckler J., Bibb W., Nguyen T.M., Tran M.T., Nguyen T.M., Sivapalasingam S., Gupta A., Phan T.P., Nguyen T.C., Nguyen V.C., Phung D.C., Mintz E.D. Evaluation of rapid diagnostic tests for typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 5, pp. 1885–1889. doi: 10.1128/JCM.42.5.1885-1889.2004
20. Petit P.L., Wamola I.A. Typhoid fever: a review of its impact and diagnostic problems. *East Afr. Med. J.*, 1994, vol. 71, no. 3, pp. 183–188.
21. Singh A., Verma H.N., Arora K. Surface plasmon resonance based label-free detection of Salmonella using DNA self assembly. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2015, vol. 175, no. 3, pp. 1330–1343. doi: 10.1007/s12010-014-1319-y

Авторы:

Долгова А.С., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной генетики патогенных микроорганизмов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Капитонова М.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики патогенных микроорганизмов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Шабалина А.В., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики патогенных микроорганизмов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Саитова А.Т., лаборант-исследователь, группа метагеномных исследований, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Полев Д.Е., к.б.н., руководитель группы метагеномных исследований, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Макарова М.А., д.м.н., зав. лабораторией 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;
Дедков В.Г., к.м.н., зам. директора по научной работе ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Dolgova A.S., PhD (Biology), Head of Laboratory for Molecular Genetics of Pathogens, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Kapitonova M.A., Junior Researcher, Laboratory for Molecular Genetics of Pathogens, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Shabalina A.V., Junior Researcher, Laboratory for Molecular Genetics of Pathogens, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Saitova A.T., Research Laboratory Assistant, Metagenomic Research Group, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Polev D.E., PhD (Biology), Head of Metagenomic Research Group, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Makarova M.A., DSc (Medicine), Head of 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;
Dedkov V.G., PhD (Medicine), Deputy Director for Scientific Work, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.12.2023
Отправлена на доработку 11.12.2023
Принята к печати 23.12.2023

Received 04.12.2023
Revision received 11.12.2023
Accepted 23.12.2023

СВЯЗЬ ИСХОДОВ ИНТЕНСИВНОЙ ФАЗЫ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫМ ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ С АКТИВНОСТЬЮ ФЕРМЕНТОВ ПУРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА И ЧИСЛЕННОСТЬЮ ПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ CD3⁺CD8⁺

М.Е. Дьякова¹, Н.Б. Серебряная^{3,4}, Д.С. Эсмедляева¹, П.К. Яблонский^{1,2}

¹ ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

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

³ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Мониторинг активности воспалительного процесса, субпопуляций лимфоцитов может уже на ранних этапах лечения помочь оценить эффективность интенсивной фазы терапии (ИФТ). Цель исследования — определить связь изменения концентрации и активности ферментов, связанных с метаболизмом пуринов, и субпопуляционного состава лимфоцитов крови с эффективностью ИФТ у больных с впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких (ИТЛ). *Материалы и методы.* У 141 обследованного больного с верифицированным диагнозом ИТЛ результаты ИФТ представлены в следующих градациях: «значительное улучшение» — исчезновение симптомов интоксикации, абациллирование, закрытие полостей распада; «менее выраженное улучшение» — ликвидация симптомов интоксикации, абациллирование, выраженное рассасывание очаговых и инфильтративных изменений, уменьшение полостей распада. Оценивали активность аденозиндезаминазы в сыворотке крови (eADA-1, 2), мононуклеарах и нейтрофилах, концентрацию экто-5'-нуклеотидазы (eNT5E) в сыворотке крови, CD26 (DPPIV) в сыворотке (s, растворимая форма) и мононуклеарах (m, мембранная форма), субпопуляционный состав лимфоцитов. *Результаты.* У больных ИТЛ выявлено увеличение концентрации eNT5E, mCD26 (DPPIV), активности eADA-2 и напротив, снижение внутриклеточной активности ADA-1. В ходе ИФТ отмечалось повышение концентрации sCD26 (DPPIV) в группе «менее выраженное улучшение». Исследуемые группы различались по количеству лимфоцитов и доле CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов. Кроме того, активность eADA-2, более высокая у больных группы «менее выраженное улучшение», еще возросла после ИФТ, чего не наблюдалось у больных группы «значительное улучшение». Концентрация

Адрес для переписки:

Дьякова Марина Евгеньевна
194064, Россия, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2–4,
ФГБНУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский
институт фтизиопульмонологии.
Тел.: 8 921 375-54-32. E-mail: marinadyakova@yandex.ru

Contacts:

Marina E. Dyakova
194064, Russian Federation, St. Petersburg, Ligovskiy pr., 2–4,
St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology.
Phone: +7 921 375-54-32. E-mail: marinadyakova@yandex.ru

Для цитирования:

Дьякова М.Е., Серебряная Н.Б., Эсмедляева Д.С., Яблонский П.К. Связь исходов интенсивной фазы терапии у больных с впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких с активностью ферментов пуринового метаболизма и численностью популяции лимфоцитов CD3⁺CD8⁺ // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 77–85. doi: 10.15789/2220-7619-RBT-17607

Citation:

Dyakova M.Ye., Serebryanaya N.B., Esmedlyayeva D.S., Yablonskiy P.K. Relationship between the outcomes of intensive phase therapy in patients with newly diagnosed infiltrative pulmonary tuberculosis and activity of purine metabolism enzymes as well as CD3⁺CD8⁺ lymphocyte level // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 77–85. doi: 10.15789/2220-7619-RBT-17607

© Дьякова М.Е. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-RBT-17607>

mCD26 (DPPIV) была выше у больных группы «значительное улучшение» до начала терапии, и, хотя в группе «менее выраженное улучшение» после ИФТ этот показатель увеличился, он все же оставался ниже, чем в группе сравнения. *Заключение.* Таким образом, исход ИФТ у больных ИТЛ связан с распределением популяций Т-лимфоцитов в крови и изменением активности ферментов пуринового метаболизма. Исследование eADA-2, CD26 (DPPIV) в мембранной и растворимой формах и относительное количество CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови на ранних этапах терапии может дать необходимую информацию для коррекции персонализированной патогенетической терапии больных впервые выявленным ИТЛ.

Ключевые слова: ферменты пуринового метаболизма, популяции лимфоцитов, исходы терапии, туберкулез.

RELATIONSHIP BETWEEN THE OUTCOMES OF INTENSIVE PHASE THERAPY IN PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED INFILTRATIVE PULMONARY TUBERCULOSIS AND ACTIVITY OF PURINE METABOLISM ENZYMES AS WELL AS CD3⁺CD8⁺ LYMPHOCYTE LEVEL

Dyakova M.Ye.^a, Serebryanaya N.B.^{c,d}, Esmedlyaeva D.S.^a, Yablonskiy P.K.^{a,b}

^a St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

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

Abstract. Monitoring activity of inflammatory process and lymphocyte subsets can help assess the effectiveness of intensive phase therapy (IPT) already in the early stages of treatment. The goal is to evaluate changes in the concentration and activity of enzymes associated with purine metabolism and peripheral blood lymphocyte subset composition, and to determine their relationship with IPT effectiveness in patients with newly diagnosed infiltrative pulmonary tuberculosis (IPTb). Materials and methods. In 141 IPTb patients, the IPT data were presented as follows: “significant improvement” (SI) — disappearance of intoxication symptoms, abacillation, closure of decay cavities; “less pronounced improvement” (LMI) — eliminated symptoms of intoxication, abacillation, pronounced resorption of focal and infiltrative changes, reduction of decay cavities. We assessed the activity of adenosine deaminase in blood serum (eADA-1, 2), mononuclear cells and neutrophils, the concentration of blood serum ecto-5'-nucleotidase (eHT5E), CD26 (DPPV) in blood serum (s, soluble form) and mononuclear cells (m, membrane form), subpopulation composition. Results. Patients exhibit increased concentrations of eNT5E, mCD26 (DPPIV) and eADA-2 activity, and decreased intracellular ADA-1 activity. In the “LMI” group, after IPT, an increased sCD26 (DPPV) level was noted. The groups differed in lymphocyte counts and percentage of CD3⁺CD8⁺ cells. eADA-2 activity was higher in the LMI group and increased after IPT, in contrast to comparison group. mCD26 (DPPIV) concentrations are higher in PD patients before therapy and after IPT. Conclusion. Thus, the outcome of IPT in IPTb patients is associated with altered T-lymphocyte populations and severity of the inflammatory process. Studying the activity of membrane and soluble eADA-2, CD26 (DPPIV) and percentage of CD3⁺CD8⁺ T-lymphocytes in the early stages of therapy can provide the necessary information for correcting personalized pathogenetic therapy of patients with newly diagnosed IPTb.

Key words: purine metabolism enzymes, lymphocyte population, the outcomes of therapy, tuberculosis.

Введение

Специфическое воспаление при туберкулезе возникает в результате сложного многофазного ответа, направленного на защиту организма от *Mycobacterium tuberculosis*, опосредуемого взаимодействием между иммунными клетками и растворимыми медиаторами. Эффективность защитных иммунных реакций при туберкулезе существенно зависит от определенных субпопуляций Т-лимфоцитов [24]. Мониторинг активности воспалительного процесса, субпопуляций лимфоцитов может уже на ранних этапах лечения помочь оценить эффективность интенсивной фазы противотуберкулезной терапии [1, 2, 35].

Среди медиаторов, регулирующих активность воспалительных клеток и лимфоцитов,

особое внимание в последнее десятилетие привлекает аденозин — противовоспалительный пуриновый регулятор. Известно, что аденозин модулирует многочисленные биологические функции посредством связывания с четырьмя специфическими рецепторами P1-типа (A1, A2A, A2B, A3). Аденозин в основном синтезируется внутриклеточно, но также высвобождается с помощью нуклеозидного транспортера ENT [26]. Также аденозин образуется внеклеточно из АТФ через трансформацию до АМФ каскадом эктонуклеотидаз CD39 (эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза NTPD-ase) и CD73 (экто-5'-эктонуклеотидаза), и дезаминированием АМФ до инозина аденозиндезаминазой (ADA). Внеклеточные концентрации аденозина в физиологических условиях поддерживаются на низком уровне, но повышаются в условиях ги-

поксии, повреждения тканей и воспаления [28]. Снижение концентрации аденозина внутри клеток происходит при увеличении активности эктоизофермента eADA-1, а в сыворотке крови — eADA-2, на который приходится более 75% внеклеточной активности [7, 12, 17, 30]. eADA-2 не только снижает повышенные концентрации внеклеточного аденозина, но индуцирует дифференцировку моноцитов в макрофаги и стимулирует пролиферацию CD4⁺ Т-клеток и макрофагов [31, 34]. eADA-1 на поверхности клеток взаимодействует с дипептидилпептидазой-4 (CD26 (DPPIV)), этот комплекс усиливает активацию, адгезию и дифференцировку лимфоцитов [10, 14, 25]. Мембранная форма (m)CD26 (DPPIV) определена как костимулирующая молекула, представленная преимущественно на CD4⁺ Т-клетках памяти [27].

В дополнение к своей мембранной форме фермент CD26 (DPPIV) также присутствует в плазме крови в растворимой форме (s) CD26 (DPPIV). Показано, что sCD26 (DPPIV) может стимулировать воспаление, увеличивая секрецию провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин (IL)-6, IL-8 и MCP-1, и усиливая экспрессию Toll-подобных рецепторов [22, 33].

Цель настоящего исследования — оценить изменения концентрации и активности ферментов, связанных с метаболизмом пуринов, и субпопуляционный состав лимфоцитов крови, определить их связь с эффективностью интенсивной фазы терапии у больных с впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких.

Материалы и методы

Обследован 141 больной с верифицированным диагнозом впервые выявленного инфильтративного туберкулеза легких (ИТЛ, 62 мужчины и 79 женщин в возрасте от 18 до 65 лет, Me — 29), находившихся на лечении в клинике ФГБУ СПб НИИФ МЗ РФ. Анализ проводили в группах, сформированных ретроспективно согласно результату терапии в интенсивной фазе лечения. У всех пациентов после завершения интенсивной фазы терапии (ИФТ) зафиксировано улучшение. Результаты терапии были представлены в следующих градациях: «значительное улучшение», n = 88 (исчезновение симптомов интоксикации, абациллирование, закрытие полостей распада); «менее выраженное улучшение», n = 53 (ликвидация симптомов интоксикации, абациллирование, выраженное рассасывание очаговых и инфильтративных изменений, уменьшение полостей распада). Клиническая характеристика больных анализируемых групп представлена в табл. 1.

Обследование пациентов проводили перед началом противотуберкулезной химиотерапии и по окончании ИФТ. Референсную группу составили здоровые доноры (РГ) (n = 35).

Пуриновый метаболизм оценивали по активности аденозиндезаминазы (ADA-1 и ADA-2) в сыворотке крови (eADA), лизированных мононуклеарах и нейтрофилах, определяемой методом G. Giusti (1974) на спектрофотометре PV1251C (Беларусь). Концентрацию экто-5'-нуклеотидазы (eNT5E) в сыворотке крови, CD26 (DPPIV) в сыворотке (s, растворимая форма) и в лизированных мононуклеарах (m, мембранная форма) определяли методом ELISA (Ecto NT5E, USCN, Китай и Humans CD26 Platinum ELISA, eBioscience, Австрия), согласно протоколу производителя, на фотометре для микропланшетов автоматической серии «ELx808» производства Bio Tek Instruments Inc. (США).

Определение субпопуляционного состава лимфоцитов крови основывалось на оценке их поверхностного фенотипа с использованием набора моноклональных антител фирмы Becton Dickinson (США) к маркерам клеточной дифференцировки (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) и проточного цитофлюориметра (FACS Calibur, BD, США).

Мононуклеары выделяли из периферической крови в градиенте плотности верографин — фиколл (1,077 г/л), из оставшегося осадка (после лизиса эритроцитов и дополнительного центрифугирования) — нейтрофилы.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 10. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [Q1; Q3]. Оценивали достоверность различий метрических величин (критерий Вилкоксона), их корреляционную зависимость между собой (критерий Спирмена) и с количественными признаками (критерий Крускала—Уоллеса).

Результаты

Оценка показателей пуринового метаболизма у больных ИТЛ выявила статистически значимое увеличение концентрации eNT5E, CD26 (DPPIV) в мононуклеарах, активности eADA-2 и, напротив, снижение внутриклеточной активности ADA-1 по сравнению с референсными значениями (табл. 2). Такие результаты свидетельствуют о повышенной активности эктоферментов, обеспечивающих образование и трансформацию внеклеточного аденозина. При этом выявили, что в ходе терапии значимо снижалась активность eADA-1 в группе «значительное улучшение» и повышалась концентрация sCD26 (DPPIV) в группе «менее выраженное улучшение».

Таблица 1. Клиническая характеристика больных в группах по результатам лечения, абс. (%)

Table 1. Treatment outcome-related clinical characteristics of patients, abs. (%)

Признаки Signs	Значительное улучшение Significant improvement	Менее выраженное улучшение Less pronounced improvement
Распространенность процесса в легком Magnitude of pulmonary process		
Ограниченный Limited	51 (58)	24 (45,3)
Распространенный Extended	37 (42)	29 (54,7)
Наличие полости Presence of a cavity		
Нет No	21 (23,9)	11 (20,7)
Есть Yes	67 (76,1)	42 (79,3)
Бактериовыделение Bacterial excretion		
Нет No	25 (28,4) ^{*(p = 0,037)}	7 (13,2)
Есть Yes	63 (71,6)	46 (86,8)
Резистентность к лекарственным препаратам Drug resistance		
Нет No	40 (63,5)	20 (43,5)
Есть Yes	23 (36,5)	26 (56,5) ^{*(p = 0,047)}

Примечание. Оценка качественных признаков проводилась с использованием таблиц сопряженности (Crosstabulation tables); * — различия статистически значимы между группами «значительное улучшение» и «менее выраженное улучшение».

Note. The assessment of qualitative characteristics was carried out using contingency tables (Crosstabulation tables); * — significant differences between the "significant improvement" and "less pronounced improvement" groups.

Как свидетельствуют представленные в табл. 2 данные, в группе «значительное улучшение» активность eADA-2 была умеренно повышена как до лечения, так и по окончании ИФТ, что можно связать с увеличением активности клеток моноцитарно-макрофагального звена в присутствии патогена.

У больных с менее выраженным улучшением активность eADA-2 в ходе терапии значимо повышалась, а концентрация mCD26 (DPPIV) хотя и повышалась, но оставалась значимо более низкой, чем в группе больных со значительным улучшением. После завершения ИФТ у больных с менее выраженным улучшением зарегистрировали наиболее высокие значения активности eADA-2, этот показатель превысил не только референсные значения, но и показатели больных со значительным улучшением как до лечения, так и после окончания ИФТ. Такое повышение активности eADA-2 у больных с менее выраженным улучшением, по-видимому, связано с более тяжелым течением заболевания, при котором увеличение концентрации внеклеточного аденозина может усиливать продукцию провоспалительных цитокинов и активировать

тучные клетки и макрофаги, что способствует тканевому повреждению [7, 34].

Представленные в табл. 3 данные свидетельствуют, что у больных обеих групп ИТЛ по сравнению с референсной группой статистически значимо увеличено относительное содержание Т-лимфоцитов, Т-хелперов, а абсолютное содержание Т-лимфоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов значимо не изменялось. При этом в группе «значительное улучшение» статистически значимо повышено абсолютное содержание Т-хелперов и иммунорегуляторный индекс (соотношение Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток) как по сравнению с референсной группой, так и с группой «менее выраженное улучшение». А в группе «менее выраженное улучшение» значимо снижено абсолютное число лимфоцитов по сравнению с группой «значительное улучшение», и также снижено относительное число лимфоцитов по сравнению как с референсной группой, так и группой сравнения и, напротив, повышено относительное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению как с референсной группой, так и группой сравнения.

Проведение ИФТ существенно не повлияло на показатели субпопуляции лимфоцитов, можно отметить только небольшое снижения относительного содержания Т-хелперов в группе «менее выраженное улучшение».

Представленные данные в табл. 2 и 3 свидетельствуют, что исследуемые группы больных ИТЛ различаются по количеству лимфоцитов и доле цитотоксических лимфоцитов CD3⁺CD8⁺, кроме того, активность eADA-2, более высокая в группе больных с менее выраженным улучшением, еще возросла после ИФТ, чего не наблюдалось в группе больных со значительным улучшением. Напротив, концентрация mCD26 (DPPIV) была выше у больных со значительным улучшением до начала терапии, и, хотя в группе с менее выраженным улучшением после терапии этот показатель увеличивался, он все же оставался существенно ниже, чем в группе сравнения.

Проведенный анализ выявил в группе «значительное улучшение» корреляционную связь между внутриклеточной активностью ADA-1 и концентрацией eNT5E ($r = 0,38$; $p = 0,01$), что

свидетельствует о согласованной работе ферментов по образованию и утилизации аденозина, что предотвращает повышение уровня аденозина в клетках и, частично, во внеклеточной среде. В этой же группе определена взаимосвязь активности eADA-1 с уровнем mCD26 (DPPIV) моноцитов ($r = 0,3$; $p = 0,05$), что, вероятно, связано с образованием молекулярного комплекса, который более эффективно уменьшает концентрацию внеклеточного аденозина и регулирует функцию иммунных клеток [15].

Показано, что активность ферментов пуринового метаболизма влияет на функциональное состояние клеток иммунной системы, причем mCD26 (DPPIV) может активировать Т-клетки, тогда как eNT5E является их ингибитором [3, 22, 23]. Выявленная нами отрицательная взаимосвязь между mCD26 (DPPIV) и eNT5E ($r = -0,34$; $p = 0,037$) полностью соответствует представлениям об этой регуляторной функции ферментов.

Другая установленная взаимосвязь между активностью eADA-2 и количеством моноцитов ($r = 0,3$; $p = 0,007$), вероятно, отражает высво-

Таблица 2. Показатели пуринового метаболизма у больных ИТЛ в исследуемых группах, Ме [Q1; Q3]
Table 2. Indicators of purine metabolism in IPTb patients in study groups, Me [Q1; Q3]

Показатели Indicators	Группы Groups				
	Референсная Reference	Значительное улучшение Significant improvement		Менее выраженное улучшение Less pronounced improvement	
		До лечения Before treatment	После лечения After treatment	До лечения Before treatment	После лечения After treatment
В сыворотке крови In blood serum					
eNT5E, ng/ml	0,06 [0,01; 0,6]	0,58 * $(p = 0,02)$ [0,4; 1,1]		1,4 * $(p = 0,001)$ [0,7; 1,6]	
eADA-1, E/l	3,3 [2,2; 4,2]	2,6 * $(p = 0,0007)$ [1,6; 3,1]	2,4 * $(p = 0,02)$ [1,7; 3,5]	2,8 [2,1; 3,7]	2,3 * $(p = 0,002)$ [1,4; 3,0]
eADA-2, E/l	11,2 [9,6; 12,1]	13,1 * $(p = 0,000000)$ [11,5; 15,5]	13,1 * $(p = 0,00001)$ [10,9; 15,5]	15,5 * $(p = 0,00000)$, ** $(p = 0,002)$ [12,9; 18,2]	18,0 * $(p = 0,001)$, ** $(p = 0,01)$, *** $(p = 0,007)$ [12,0; 25,0]
sCD26 (DPPIV), ng/ml	692,5 [625,0; 875,0]	555,5 [380,0; 977,3]	1016,0 *** $(p = 0,0003)$ [690,0; 1555,0]	491,2 * $(p = 0,004)$ [312,5; 611,5]	775,0 *** $(p = 0,003)$ [493,5; 1653,7]
В мононуклеарах In mononuclear cells					
ADA-1, E/10 ⁶ cells	2,0 [1,1; 3,0]	0,91 * $(p = 0,000000)$ [0,5; 1,5]	1,1 * $(p = 0,000007)$ [0,7; 1,7]	1,0 * $(p = 0,000002)$ [0,5; 1,6]	1,2 * $(p = 0,0004)$ [0,6; 2,0]
CD26 (DPPIV), ng/10 ⁶ cells	19,2 [12,8; 25,0]	53,3 * $(p = 0,03)$ [25,0; 101,7]	83,7 * $(p = 0,0009)$ [46,7; 110,9]	26,8 * $(p = 0,04)$, ** $(p = 0,03)$ [1,9; 53,3]	70,4 * $(p = 0,005)$ [28,9; 105,0]
В нейтрофилах In neutrophils					
ADA-1, E/10 ⁶ cells	1,5 [0,9; 1,8]	0,6 * $(p = 0,0002)$ [0,3; 1,1]	0,5 * $(p = 0,0007)$ [0,3; 1,3]	0,6 * $(p = 0,0002)$ [0,3; 1,2]	0,7 * $(p = 0,007)$ [0,4; 1,2]

Примечание. * — различия статистически значимы по сравнению с референсной группой, ** — различия статистически значимы между группами «значительное улучшение» и «менее выраженное улучшение», *** — различия статистически значимы внутри групп между сроками исследования.

Note. * — significant differences compared to reference group, ** — significant differences between the “significant improvement” and “less pronounced improvement” groups, *** — significant differences within the groups between the study periods.

Таблица 3. Субпопуляции лимфоцитов крови у больных ИТЛ в исследуемых группах, Ме [Q1; Q3]

Table 3. Peripheral blood lymphocytes subpopulations in IPTb patients, Me [Q1; Q3]

Показатели Indicators	Группы Groups				
	Референсная Reference	Значительное улучшение Significant improvement		Менее выраженное улучшение Less pronounced improvement	
		До лечения Before treatment	После лечения After treatment	До лечения Before treatment	После лечения After treatment
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Lymphocytes, $\times 10^9/\text{l}$	1,7 [1,4; 2,1]	1,8 [1,5; 2,3]	1,7 [1,2; 2,5]	1,5 [#] (p = 0,01) [1,2; 2,1]	1,3 [1,2; 1,6]
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	29,0 [28,0; 35,0]	32,0 [25,0; 39,0]	31,5 [25,0; 39,0]	22,0 [*] (p = 0,0006), ^{**} (p = 0,00008) [17,0; 28,0]	21,5 [*] (p = 0,0002), ^{**} (p = 0,0001) [17,0; 27,0]
CD3 ⁺ , $\times 10^9/\text{l}$	1,2 [1,0; 1,6]	1,4 [1,1; 1,8]	1,4 [0,9; 1,6]	1,2 [1,0; 1,6]	1,0 [0,9; 1,4]
CD3 ⁺ , %	71,0 [67,0; 74,0]	77,0 [*] (p = 0,002) [71,0; 80,0]	76,0 [*] (p = 0,01) [70,0; 82,0]	78,0 [*] (p = 0,001) [73,0; 84,0]	78,0 [*] (p = 0,009) [72,0; 82,0]
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , $\times 10^9/\text{l}$	0,6 [0,5; 1,1]	0,9 [*] (p = 0,05), ^{**} (p = 0,04) [0,7; 1,1]	0,76 [0,6; 1,0]	0,77 [0,6; 0,9]	0,7 [0,5; 1,0]
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	40,0 [36,0; 45,0]	48,0 [*] (p = 0,0001) [43,0; 54,0]	48,0 [*] (p = 0,001) [40,0; 54,0]	47,0 [*] (p = 0,0003) [44,0; 53,0]	46,0 ^{***} (p = 0,03) [42,0; 49,0]
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , $\times 10^9/\text{l}$	0,5 [0,4; 0,6]	0,5 [0,3; 0,6]	0,4 [0,3; 0,6]	0,5 [0,3; 0,6]	0,4 [0,3; 0,6]
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	26,0 [23,0; 30,0]	25,0 [21,0; 30,0]	25,0 [21,0; 30,0]	31,0 [*] (p = 0,05), ^{**} (p = 0,007) [25,0; 35,0]	30,5 ^{**} (p = 0,01) [24,5; 35,0]
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,4 [1,3; 1,8]	1,9 [*] (p = 0,006), ^{**} (p = 0,04) [1,5; 2,4]	1,8 [1,4; 2,1]	1,7 [1,3; 1,9]	1,5 [1,2; 1,9]

Примечание. * — различия статистически значимы по сравнению с референсной группой, ** — различия статистически значимы между группами «значительное улучшение» и «менее выраженное улучшение», *** — различия статистически значимы внутри групп между сроками исследования.

Note. * — significant differences compared to reference group, ** — significant differences between the “significant improvement” and “less pronounced improvement” groups, *** — significant differences within the groups between the study periods.

бождение фермента из моноцитов/макрофагов в ответ на инвазию *Mycobacterium tuberculosis* и повышение уровня внеклеточного аденозина [16, 34]. Отмеченная отрицательная корреляция между уровнем sCD26 (DPPIV) и активностью ADA-1 в моноцитах и нейтрофилах ($r = -0,35$; $p = 0,02$ и $r = -0,63$; $p = 0,000008$ соответственно), вероятно, подтверждает предположение Gorell M.D. с соавт., что sCD26, «отвлекая» аденозиндезаминазу [15], уменьшает активность комплекса mCD26 с eADA-1, регулируя активность воспалительных клеток.

У больных с менее выраженным улучшением существенно увеличена активность eADA-2 в сыворотке крови, и можно предположить, что частичное увеличение активности eADA-2 в этой группе больных происходит вследствие разрушения моноцитов/макрофагов, так как, по мнению Hashikawa T. с соавт., лизированные клетки при воспалительных поражениях могут быть источником аденозиндезаминазы [16].

В этой группе больных выявлена корреляция между активностью eADA-2 и концентрацией eNT5E ($r = 0,35$; $p = 0,03$), которая иллюстрирует появление согласованной активности ферментов, участвующих в образовании и дезамини-

ровании внеклеточного аденозина в условиях повышенного внеклеточного уровня пуринергических регуляторов АТФ, АМФ и аденозина.

Исследованиями ряда авторов показана способность ADA связываться с иммунными клетками, усиливая пролиферацию CD4⁺ Т-клеток [20, 34]. Выявленные нами корреляции в группе «значительное улучшение» между активностью eADA-2 и абсолютным содержанием Т-лимфоцитов ($r = 0,26$; $p = 0,04$), Т-хелперов ($r = 0,28$; $p = 0,03$), цитотоксических Т-лимфоцитов ($r = 0,34$; $p = 0,006$), вероятно, свидетельствуют, что eADA-2 стимулирует активацию и пролиферацию Т-клеток. Интересно, что в этой группе больных («значительное улучшение») активность eADA-1 имела обратную связь с абсолютным содержанием Т-лимфоцитов ($r = -0,35$; $p = 0,006$), Т-хелперов ($r = -0,36$; $p = 0,005$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($r = -0,38$; $p = 0,002$). Выявленные разнонаправленные взаимосвязи позволяют предположить, что именно умеренной активностью eADA-2, близкой к нормальным значениям (табл. 2), создаются условия для пролиферации Т-лимфоцитов, в то время как внутриклеточные концентрации аденозина, которые регулируются eADA-1, оказы-

вают противоположный эффект в отношении пролиферации Т-лимфоцитов и их субпопуляций CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺. В целом наше исследование подтверждает заключение, сделанное Dhanwani R. с соавт., что eADA-2 является функциональным регулятором иммунных реакций и воспаления [11].

Повышенные доли CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов, которое зафиксировано у больных с менее выраженным улучшением как до лечения, так и после завершения ИФТ (табл. 3), по-видимому, вызвано их экспансией в ответ на продукты *Mycobacterium tuberculosis* в условиях персистирующей инфекции [4]. Кноринг Б.Е. с соавт. сделали предположение об участии цитотоксических Т-лимфоцитов как в защитных реакциях, так и в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции [5]. В нашем случае статистически значимое повышение доли CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов ассоциировано с сохранением полостей распада после лечения. Это согласуется с исследованиями Andersson J. с соавт., которые показали зависимость присутствия CD8⁺ Т-лимфоцитов и экспрессии ими перфорина и гранулизына в инфицированных участках с наличием полостей распада [6]. Нужно отметить, что после окончания ИФТ в этой группе больных прослеживается корреляция между долей цитотоксических Т-лимфоцитов и активностью eADA-2 ($r = 0,45$; $p = 0,47$), которая иллюстрирует связь пуринергических показателей с пролиферацией этой субпопуляции Т-лимфоцитов.

Ряд исследователей на мышинной модели показали, что привлечение CD8⁺ Т-клеток ингибируется при повышении активности дипептидилпептидазы-IV [18]. Вероятно, эту закономерность иллюстрирует полученная нами отрицательная корреляция у больных со значительным улучшением между mCD26 (DPPIV) и цитотоксическими Т-клетками, как до лечения ($r = -0,41$; $p = 0,02$), так и после лечения ($r = -0,54$; $p = 0,02$).

В группе больных с менее выраженным улучшением после окончания ИФТ появляется положительная ассоциация между уровнем mCD26 (DPPIV) и CD4⁺ Т-клетками ($r = 0,57$; $p = 0,0048$), которая подтверждает стимулирующую роль CD26 (DPPIV) при пролиферации Т-лимфоцитов-хелперов.

Ряд исследователей рассматривают растворимую форму CD26 (DPPIV) как негативный регулятор острой фазы воспаления, так как концентрации этого фермента снижены у пациентов с ревматоидным артритом, воспалительными заболеваниями кишечника, васкулитами, ассоциированными с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (АНЦА) и системной красной волчанкой [8, 19, 21, 29]. Показано, что уровень sCD26 (DPPIV) отражает активность воспаления при этих системных заболеваниях [9, 13, 32]. В нашем исследовании показано, что самые низкие концентрации sCD26 (DPPIV) отмечаются у больных с менее выраженным улучшением до начала лечения, а после завершения ИФТ его концентрации возрастают по сравнению с исходным уровнем в обеих группах ИТЛ, что подтверждает отрицательную связь сывороточной концентрации этого фермента с активностью воспаления.

Таким образом, можно заключить, что исход интенсивной фазы терапии у больных ИТЛ связан с распределением популяций Т-лимфоцитов в крови и остротой воспалительного процесса. При оценке перечисленных характеристик существенную информацию позволяют получить данные об активности ферментов пуринового метаболизма — eADA-2, CD26 (DPPIV) в мембранной и растворимой формах и относительное количество CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови. Исследование перечисленных показателей на ранних этапах терапии может дать необходимую информацию для коррекции персонализированной патогенетической терапии больных впервые выявленным ИТЛ.

Список литературы/References

1. Багишева Н.В., Мордык А.В., Гольтыпин В.В. Прогнозирование результатов лечения туберкулеза у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких // Медицинский Альянс. 2019. Т. 7, № 1. С. 13–19. [Bagisheva N., Mordyk A., Golytshin V. Prediction of the results of tuberculosis treatment in patients with chronic obstructive lung disease. *Meditsinskii Alyans = Medical Alliance*, 2019, vol. 7, no. 1, pp. 13–19. (In Russ.)]
2. Багишева Н.В., Мордык А.В., Гольтыпин В.В., Моисеева М.В., Батищева Т.Л., Ситникова С.В., Ширинская Н.В. Варианты прогноза эффективности терапии туберкулеза: в фокусе пациенты с хронической обструктивной болезнью легких // Медицинский Альянс. 2023. Т. 11, № 1. С. 19–25. [Bagisheva N., Mordyk A., Golytshin V., Moiseeva M., Batishcheva T., Sitnikova S., Shirinskaya N. Options in predicting the effectiveness of tuberculosis therapy: focus on patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Meditsinskii Alyans = Medical Alliance*, 2023, vol. 11, no. 1, pp. 19–25. (In Russ.)] doi: 10.36422/23076348-2023-11-1-19-25
3. Иванова Е.А., Золотов Н.Н., Позднев В.Ф., Воронина Т.А. Активность дипептидилпептидазы IV при экссудативном воспалении у грызунов // Патогенез. 2018. Т. 16, № 1. С. 51–57. [Ivanova E., Zolotov N., Pozdnev V., Voronina T. Alteration of dipeptidyl peptidase IV activity in rodents with exudative inflammation. *Patogenez = Pathogenesis*, 2018, vol. 16, no. 1, pp. 51–57. (In Russ.)] doi: 10.25557/2310-0435.2018.01.51-57

4. Кетлинский С.А. Генетический анализ чувствительности организма к туберкулезной инфекции // Вестник Российской академии медицинских наук. 2001. № 1. С. 11–24. [Ketlinsky S.A. Genetic analysis of the body's sensitivity to tuberculosis infection. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2001, no. 1, pp. 11–24. (In Russ.)]
5. Кноринг Б.Е., Давыдова Н.И., Басек Т.Ф., Ница Н.А., Елькин А.В. Показатели иммунитета у больных прогрессирующим фиброзно-кавернозным туберкулезом в зависимости от выраженности деструктивных изменений в легких // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 4–5. С. 329–336. [Knoring B.E., Davydova N.A., Basek T.S., Nica N.A., Elkin A.V. Immune indexes in patients with progressive fibrous-cavernous tuberculosis dependent on severity of destructive changes in the lungs. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 4–5, pp. 329–336. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-329-336
6. Andersson J., Samarina A., Fink J., Rahman S., Grundström S. Impaired expression of perforin and granulysin in CD8₊ T cells at the site of infection in human chronic pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, no. 11, pp. 5210–5222. doi: 10.1128/IAI.00624-07
7. Antonioli L., Csóka B., Fornai M., Colucci R., Kókai E., Blandizzi C., Haskó G. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discov. Today*, 2014, vol. 19, no. 8, pp. 1051–1068. doi: 10.1016/j.drudis.2014.02.010
8. Busso N., Wagtman N., Herling C., Chobaz-Péclat V., Bischof-Delaloye A., So A., Grouzmann E. Circulating CD26 is negatively associated with inflammation in human and experimental arthritis. *Am. J. Pathol.*, 2005, vol. 166, no. 2, pp. 433–442. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62266-3
9. Ciferská H., Horák P., Heřmanová Z., Ordeltová M., Zdražil J., Tichý T., Ščudla V. The levels of sCD30 and of sCD40L in a group of patients with systemic lupus erythematoses and their diagnostic value. *Clin. Rheumatol.*, 2007, vol. 26, no. 5, pp. 723–728. doi: 10.1007/s10067-006-0389-9
10. Cortés A., Gracia E., Moreno E., Mallol J., Lluís C., Canela E.I., Casadó V. Moonlighting adenosine deaminase: a target protein for drug development. *Med. Res. Rev.*, 2015, vol. 35, no. 1, pp. 85–125. doi: 10.1002/med.21324
11. Dhanwani R., Takahashi M., Mathews I.T., Lenzi C., Romanov A., Jeramie D., Watrous J.D., Pieters B., Hedrick C.C., Benedict C.A., Linden J., Nilsson R., Jain M., Sharma S. Cellular sensing of extracellular purine nucleosides triggers an innate IFN- β response. *Sci. Adv.*, 2020, vol. 6, no. 30: eaba3688. doi: 10.1126/sciadv.aba3688
12. Eltzschig H.K., Thompson L.F., Karhausen J., Cotta R.J., Ibla J.C., Robson S.C., Colgan S.P. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood*, 2004, vol. 104, no. 13, pp. 3986–3992. doi: 10.1182/blood-2004-06-2066
13. Gao R., Sun W., Chen Y., Su Y., Wang C., Dong L. Elevated serum levels of soluble CD30 in ankylosing spondylitis patients and its association with disease severity-related parameters. *Biomed Res. Int.*, 2015, vol. 2015, pp. 617282–617288. doi: 10.1155/2015/617282
14. Ginés S., Mariño M., Mallol J., Canela E.I., Morimoto C., Callebaut C., Hovanessian A., Lluís C., Franco R. Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. *Biochem J.*, 2002, vol. 361, pp. 203–209. doi: 10.1042/0264-6021:3610203
15. Gorrell M.D., Gysbers V., McCaughan G.W. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.*, 2001, vol. 54, pp. 249–264.
16. Hashikawa T., Takedachi M., Terakura M., Yamada S., Thompson L.F., Shimabukuro Y., Murakami S. Activation of adenosine receptor on gingival fibroblasts. *J. Dent Res.*, 2006, vol. 85, no. 8, pp. 739–744. doi: 10.1177/154405910608500810
17. Haskó G., Cronstein B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.*, 2004, vol. 25, no. 1, pp. 33–39. doi: 10.1016/j.it.2003.11.003
18. Henderson J.M., Xiang M.S.W., Huang J.C., Wetzel S., Jiang L., Lai J.H., Wu W., Kench J.G., Bachovchin W.W., Roediger B., McCaughan G.W., Zhang H.E., Gorrell M.D. Dipeptidyl peptidase inhibition enhances CD8 T cell recruitment and activates intrahepatic inflammasome in a murine model of hepatocellular carcinoma. *Cancers*, 2021, vol. 13: 5495. doi: 10.3390/cancers13215495
19. Hildebrandt M., Rose M., Ruter J., Salama A., Monnikes H., Klapp B.F. Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) in patients with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2001, vol. 36, no. 10, pp. 1067–1072. doi: 10.1080/003655201750422675
20. Kaljas Y., Liu C., Skaldin M., Wu C., Zhou Q., Lu Y., Aksentijevich I., Zavialov A. Human adenosine deaminases ADA1 and ADA2 bind to different subsets of immune cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2017, vol. 74, no. 3, pp. 555–570. doi: 10.1007/s00018-016-2357-0
21. Kobayashi H., Hosono O., Mimori T., Kawasaki H., Dang N.H., Tanaka H., Morimoto C. Reduction of serum soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enzyme activity and its correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.*, 2002, vol. 29, no. 9, pp. 1858–1866.
22. Lee D.S., Lee E.S., Alam M.M., Jang J.H., Lee H.S., Oh H., Kim Y.-C., Manzoor Z., Koh Y.-S., Kang D.-G., Lee D.H. Soluble DPP-4 up-regulates toll-like receptors and augments inflammatory reactions, which are ameliorated by vildagliptin or mannose-6-phosphate. *Metabolism*, 2016, vol. 65, no. 2, pp. 89–101. doi: 10.1016/j.metabol.2015.10.002
23. Liang D., Shao H., Born W.K., O'Brien R.L., Kaplan H.J., Sun D. High level expression of A2ARs is required for the enhancing function, but not for the inhibiting function, of $\gamma\delta$ T cells in the autoimmune responses of EAU. *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 6: e0199601. doi: 10.1371/journal.pone.0199601
24. Lyadova I.V., Pantelev A.V. Th1 and Th17 cells in tuberculosis: protection, pathology, and biomarkers. *Mediators Inflamm.*, 2015, vol. 2015, no. 10: 854507. doi: 10.1155/2015/854507
25. Martínez-Navio J.M., Casanova V., Pacheco R., Naval-Macabuhay I., Climent N., Garcia F., Gatell J.M., Mallol J., Gallart T., Lluís C., Franco R.J. Adenosine deaminase potentiates the generation of effector, memory, and regulatory CD4⁺ T cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2011, vol. 89, no. 1, pp. 127–136. doi: 10.1189/jlb.1009696
26. Ohta A., Sitkovsky M. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Front. Immunol.*, 2014, vol. 5, pp. 304–313. doi: 10.3389/fimmu.2014.00304

27. Pan K., Ohnuma K., Morimoto C., Dang N.H. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its multiple biological functions. *Cureus*, 2021, vol. 13, no. 2: e13495. doi: 10.7759/cureus.13495
28. Pasquini S., Contri C., Borea P.A., Vincenzi F., Varani K. Adenosine and inflammation: here, there, and everywhere. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22: 7685. doi: 10.3390/ijms22147685
29. Schonermark U., Csernok E., Trabandt A., Hansen H., Gross W.L. Circulating cytokines and soluble CD23, CD26 and CD30 in ANCA-associated vasculitides. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2000, vol. 18, no. 4, pp. 457–463.
30. Thompson L.F., Eltzschig H.K., Ibla J.C., Van De Wiele C.J., Resta R., Morote-Garcia J.C., Colgan S.P. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J. Exp. Med.*, 2004, vol. 200, no. 11, pp. 1395–1405. doi: 10.1084/jem.20040915
31. Tiwari-Heckler S., Yee E.U., Yalcin Y., Yalcin Y., Park J., Nguyen D.-H.T., Gao W., Csizmadia E., Afdhal N., Mukamal K.J., Robson S.C., Lai M., Schwartz R.E., Jiang Z.C. Adenosine deaminase 2 produced by infiltrative monocytes promotes liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Cell. Rep.*, 2021, vol. 37, no. 4: 109897. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109897
32. Ulusoy H., Kamanli A., Ilhan N., Kuru O., Arslan S., Alkan G., Ozgocmen S.. Serum levels of soluble CD26 and CD30 and their clinical significance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.*, 2012, vol. 32, no. 12, pp. 3857–3862. doi: 10.1007/s00296-011-2302-3
33. Wronkowitz N., Görgens S.W., Romacho T., Villalobos L.A., Sánchez-Ferrer C.F., Peiró C., Sell H., Eckel J. Soluble DPP4 induces inflammation and proliferation of human smooth muscle cells via protease-activated receptor 2. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, vol. 1842, no. 9, pp. 1613–1621. doi: 10.1016/j.bbdis.2014.06.004
34. Zavialov A.V., Gracia E., Glaichenhaus N., Franco R., Zavialov A.V., Lauvau G. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *J. Leuk. Biol.*, 2010, vol. 88, no. 2, pp. 279–290. doi: 10.1189/jlb.1109764
35. Zhan M., Xue H., Wang Y., Wu Z., Wen Q., Shi X., Wang J. A clinical indicator-based prognostic model predicting treatment outcomes of pulmonary tuberculosis: a prospective cohort study. *BMC Infect. Dis.*, 2023, vol. 23, no. 1: 101. doi: 10.1186/s12879-023-08053-x

Авторы:

Дьякова М.Е., д.б.н., старший научный сотрудник отдела фундаментальной медицины ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;

Серебряная Н.Б., д.м.н., профессор, зав. лабораторией общей иммунологии отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Эсмедляева Д.С., к.б.н., старший научный сотрудник отдела фундаментальной медицины ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;

Яблонский П.К., д.м.н., профессор, директор ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия; проректор по медицинской деятельности ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Dyakova M.E., DSc (Biology), Senior Researcher, Department of Fundamental Medicine, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

Serebryanaya N.B., DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of General Immunology, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Esmedlyeva D.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Fundamental Medicine, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

Yablonskiy P.K., DSc (Medicine), Professor, Director of the St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation; Vice-Rector for Medical Activities, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation.

МУТАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ

Д.Э. Рейнгардт¹, Ю.В. Останкова¹, Е.В. Ануфриева¹, А.В. Семенов², Л.В. Лялина^{1,3},
А.А. Тотолян^{1,4}

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

² ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора,
г. Екатеринбург, Россия

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

⁴ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика
И.П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью нашей работы была оценка распространенности мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита С в генах *NS5A*, *NS5B*, *NS3* у ВИЧ-инфицированных лиц. Материалом исследования служили 157 образцов плазмы крови пациентов с ВИЧ, проживающих на территории Ленинградской области, с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии. Образцы обследовали на наличие анти-HCV-антител и РНК ВГС с помощью коммерческих тест-систем в соответствии с рекомендациями производителя. В случае выявления РНК ВГС осуществляли амплификацию с использованием комплекта праймеров, совместно фланкирующих гены *NS3*, *NS5A*, *NS5B*. После секвенирования нуклеотидных последовательностей указанных генов определяли субтип вируса. Для определения наличия мутаций лекарственной устойчивости ВГС к препаратам прямого противовирусного действия (ПППД) использовали программное обеспечение Geno2pheno HCV resistance (<https://hcv.geno2pheno.org>). Возраст пациентов варьировал от 18 до 65 и составил в среднем 34,3±7,27 лет. Количество мужчин в группе превосходило количество женщин — 71 и 28% соответственно. Антитела к ВГС были выявлены у 94,2% ВИЧ-инфицированных лиц. РНК ВГС выявили у 98 (61,7%) пациентов. Распределение генотипов ВГС в данной группе было следующим: 1a — 7% (n = 7), 1b — 53% (n = 52), 2 — 2% (n = 2), 3a — 38% (n = 37). Результаты определения вирусной нагрузки варьировали от 5,3 × 10³ до 2,3 × 10⁸ МЕ/мл. Нуклеотидная последовательность всех трех участков NS3, NS5A, NS5B определена в 73 образцах. Анализ мутаций лекарственной устойчивости в регионе NS3 проводили для 82 изолятов ВГС генотипов 1b (n = 46), 3a (n = 31), 1a (n = 4), 2 (n = 1). В общей сложности доля штаммов, содержащих мутации в регионе NS3, составила 9,8%. Наличие значимых аминокислотных замен в регионе NS5A проверяли для 83 изолятов ВГС генотипов 1b (n = 47), 3a (n = 30), 1a (n = 6). Процентное количество штаммов, содержащих мутации в регионе NS5A, составило 19,3%. Анализ мутаций резистентности в регионе NS5B проводили для 87 изолятов ВГС генотипов 1b (n = 48), 3a (n = 32), 2 (n = 2), 1a (n = 5). Доля штаммов, содержащих мутаций в регионе NS5B, составила 11,5%. В исследуемой нами группе мутации, ассоциированные с устойчивостью вируса гепатита С к ПППД во всех регионах, были обнаружены в 16,6% (95% ДИ: 11,11–23,32%) случаев (n = 26). В регионе NS3 — 6 значимых аминокислотных замен, в регионах NS5A и NS5B — 15 и 10 значимых аминокислотных замен соответственно.

Ключевые слова: вирус гепатита С, коинфекция ВИЧ+ВГС, мутации лекарственной устойчивости, секвенирование, препараты прямого противовирусного действия, генотип.

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:

Yuliiia 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:

Рейнгардт Д.Э., Останкова Ю.В., Ануфриева Е.В., Семенов А.В.,
Лялина Л.В., Тотолян А.А. Мутации лекарственной устойчивости вируса
гепатита С у ВИЧ-инфицированных лиц // Инфекция и иммунитет. 2024.
Т. 14, № 1. С. 86–94. doi: 10.15789/2220-7619-HDR-16597

Citation:

Reingardt D.E., Ostankova Yu.V., Anufrieva E.V., Semenov A.V., Lyalina L.V.,
Totolian A.A. HCV drug resistance mutations in HIV-infected patients //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024,
vol. 14, no. 1, pp. 86–94. doi: 10.15789/2220-7619-HDR-16597

HCV DRUG RESISTANCE MUTATIONS IN HIV-INFECTED PATIENTS

Reingardt D.E.^a, Ostankova Yu.V.^a, Anufrieva E.V.^a, Semenov A.V.^b, Lyalina L.V.^{a,c}, Totolian A.A.^{a,d}

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

^b Federal Research Institute of Viral Infections "Virom", Ekaterinburg, Russian Federation

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

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

Abstract. The aim of our work was to assess prevalence in the HCV drug resistance mutations in the *NS3*, *NS5A*, *NS5B* genes in HIV-infected patients. The material of the study was 157 blood plasma samples collected from HIV patients living in the Leningrad Region, with virological inefficiency of antiretroviral therapy. Samples were examined for the presence of anti-HCV antibodies and HCV RNA using commercial test systems in accordance with the manufacturer's recommendations. In the case of detecting HCV RNA, amplification reaction was carried out using a set of primers co-flanking the *NS3*, *NS5A*, and *NS5B* genes. After sequencing the nucleotide sequences of the above genes, the virus subtype was determined. To assess HCV drug resistance mutations to direct-acting antiviral agents (DAAs), the Geno2pheno HCV resistance software (<https://hcv.geno2pheno.org>) was used. The age of the patients varied from 18 to 65 and averaged 34.3 ± 7.27 years. The number of males vs females prevailed comprising 71% and 28%, respectively. Antibodies against HCV were detected in 94.2% cases, whereas HCV RNA — in 98 (61.7%) HIV-infected persons. The distribution of HCV genotypes in this group was as follows: 1a — 7% (n = 7), 1b — 53% (n = 52), 2 — 2% (n = 2), 3a — 38% (n = 37). The results of determining the viral load varied from 5.3×10^3 to 2.3×10^8 IU/ml. The nucleotide sequence of all three regions NS3, NS5A, NS5B was determined in 73 samples. Analysis of drug resistance mutations in the NS3 region was performed for 82 HCV isolates of genotypes 1b (n = 46), 3a (n = 31), 1a (n = 4), 2 (n = 1). In total, the proportion of strains containing mutations in the NS3 region was 9.8%. The presence of significant amino acid substitutions in the NS5A region was tested for 83 HCV isolates of genotypes 1b (n = 47), 3a (n = 30), 1a (n = 6). The percentage of strains containing mutations in the NS5A region was 19.3%. Resistance mutations in the NS5B region were analysed for 87 HCV isolates of genotypes 1b (n = 48), 3a (n = 32), 2 (n = 2), 1a (n = 5). The proportion of strains containing mutations in the NS5B region was 11.5%. In the study group, mutations associated with hepatitis C virus resistance to DAAs in all regions were found in 16.6% (95% CI: 11.11–23.32%) cases (n = 26). In the NS3, NS5A and NS5B, there have been identified 6, 15 and 10 significant amino acid substitutions, respectively.

Key words: hepatitis C virus, coinfection HIV+HCV, drug resistance mutations, sequencing, direct-acting antiviral agents, genotype.

Введение

Согласно данным ВОЗ, более 50 млн человек в мире заражены вирусом гепатита С (ВГС), при этом ежегодный прирост инфицированных лиц составляет около 1,5 млн человек. Таким образом, ВГС продолжает оставаться одной из глобальных проблем здравоохранения [17].

Заражение ВГС может приводить как к острой форме заболевания печени, так и к хронической, однако острая стадия заболевания, как правило, не манифестирует в виде характерных симптомов, либо последние отсутствуют вовсе [2]. У 15–45% пациентов наблюдается спонтанная элиминация вируса из организма в течение 6 месяцев. Вместе с тем у 55–85% пациентов может развиваться хронический гепатит С (ХГС) с дальнейшей прогрессией в цирроз печени, гепатоцеллюлярную карциному или печеночную недостаточность [7].

Различают восемь основных генотипов ВГС и более 60 субтипов. Относительно нуклеотидных последовательностей полных геномов, генетическое разнообразие между генотипами ВГС составляет около 30%, а различие между субтипами — 15% [4]. Глобальное распространение каждого генотипа ВГС географически детерминировано. Генотип 1 является наиболее часто встречаемым во всем мире и имеет широкое географическое

распространение, составляя 46% всех инфекций ВГС. Генотип 3 является вторым наиболее распространенным генотипом, на него приходится 30% инфекции, чаще встречается в Южной Азии, Австралии и в некоторых странах Европы [10]. Генотипы ВГС 2 и 4 составляют 9–13% инфекций с более ограниченным географическим распределением. Распространенность ВГС генотипа 2 выше в Азии и Западной Африке, в то время как высокая заболеваемость ВГС генотипа 4 наблюдается в центральной и восточной частях Африки к югу от Сахары, в Северной Африке и на Ближнем Востоке. Генотипы 5, 6 и 7 имеют наиболее ограниченное географическое распространение, при этом генотип 5 встречается в Южной Африке, а генотип 6 — в Восточной и Юго-Восточной Азии, в то время как инфицирование генотипом 7 и 8 было зарегистрировано у небольшого числа лиц из Демократической Республики Конго и из Индии соответственно [9, 10].

Коинфицирование ВГС и ВИЧ (ВГС/ВИЧ) весьма распространено как в России, так и во всем мире. ВГС встречается чаще у ВИЧ-инфицированных людей, чем среди населения в целом. Связано это со сходными путями распространения данных инфекций [12]. Имунные реакции хозяина влияют на генетическое разнообразие ВГС, особенно при коинфекции ВИЧ, и наблюдаются генетические

вариации в структурных генах ВГС, которые могут приводить к возникновению мутаций лекарственной устойчивости в том числе [3].

Во всем мире среди пациентов, инфицированных ВИЧ, распространенность ВГС составляет 72–92% среди потребителей инъекционных наркотических веществ (ПИН), 1–12% среди мужчин, практикующих секс с мужчинами (МСМ), и 9–27% среди гетеросексуалов [3]. В РФ распространенность ВГС-инфекции среди людей, живущих с ВИЧ, составляет около 40%. Основными группами риска являются ПИН (80–90%), пациенты, которым необходимо переливание крови (60–70%), МСМ (7–8%) [5].

До 2011 г. стандартом лечения ХГС являлась комбинация пегилированного интерферона альфа и противовирусного препарата рибавирина (ПЕГ-ИНF α /РБВ) в течение 24 или 48 недель, в зависимости от генотипа ВГС. Данная терапия сопровождалась серьезными побочными явлениями, притом что устойчивый вирусологический ответ (УВО) достигался только у 55% больных, инфицированных генотипом 1, тогда как при генотипе 2 и 3 эффективность составляла 80% и более [8]. Революцией в терапии ХГС стала разработка препаратов прямого противовирусного действия (ПППД), направленных на ключевые белки вируса: протеазу NS3, полимеразу NS5B и белок NS5A.

Благодаря появлению безинтерфероновых схем терапии, значительно увеличилась частота достижения УВО (более 90%), сократилась продолжительность курса (до 12 недель), снизилось количество побочных явлений и режим приема препарата стал более удобен для пациентов (возможность приема лекарственных средств перорально 1 раз в сутки) [6].

Однако наличие точечных мутаций из-за отсутствия корректирующей способности у РНК-зависимой РНК-полимеразы является основным элементом, способствующим высокой генетической изменчивости ВГС и, как следствие, предрасполагающим к появлению устойчивых к лекарственным препаратам геновариантов [11]. Данный феномен приводит к отсутствию УВО в условиях лечения ПППД или же к возникновению вирусологического прорыва во время терапии.

Целью нашей работы была оценка распространенности мутаций лекарственной устойчивости ВГС в генах NS3, NS5A, NS5B у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Материалы и методы

В работе использована плазма крови 157 пациентов с ВИЧ-инфекцией, проживающих на территории Ленинградской области, с вирусологической неэффективностью антиретровирусной

терапии (АРВТ). Исследование одобрено комитетом по этике ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург).

Исследование образцов на наличие серологических маркеров ВГС заключалось в качественном определении суммарных антител анти-НСV с использованием коммерческих наборов «Бест анти-ВГС» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) и «ИФА-АНТИ-НСV» (НПО «Диагностические системы», Россия) в соответствии с рекомендациями производителей.

Для выявления наличия РНК ВГС использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с помощью коммерческого набора «АмплиСенс НCV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Вирусную нагрузку ВГС и ВИЧ определяли с использованием коммерческих наборов производства ФБУН ЦНИИЭ (Россия) «АмплиСенс НCV-Монитор-FL» и «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT» соответственно согласно инструкциям производителя. Генотип ВГС определяли с использованием коммерческого набора производства ФБУН ЦНИИЭ (Россия) «АмплиСенс НCV-генотип-FL».

Обратную транскрипцию проводили с использованием коммерческого набора реагентов «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) для синтеза первой цепи кДНК согласно инструкции производителя. Реакцию останавливали нагреванием в течение 5 мин при температуре 70°C. Далее осуществляли амплификацию с использованием комплекта праймеров, совместно фланкирующих гены NS3, NS5A, NS5B ВГС.

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 3–30 пМ каждого олигопраймера для каждого генотипа, 0,8–1,0 мМ каждого дезоксинуклеотида, 5,8 мМ MgCl₂, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, США), буфер для Taq ДНК-полимеразы, 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл. Амплификацию в общем виде проводили при данных условиях: после денатурации при температуре 95°C в течение 15 мин устанавливали 30–40 циклов в режиме: 95°C — 20 с, 52–58°C — 20–30 с, 72°C — 120 с; затем финальная элонгация при температуре 72°C — 5 мин. Качество ПЦР определяли визуально методом электрофореза в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1 × TBE), окрашенном бромидом этидия.

Для последующего исследования использовали специфичные праймеры. Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору реагентов «ABI PRISM BigDye Terminator v3.1.» (Applied Biosystems, США) на прямых и обратных праймерах. Пробы исследовали с помощью генетического анализатора «ABI Prism 3500» (Applied Biosystems, США).

Первичный анализ проводили с помощью программы NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе «MEGA11», используя алгоритм ClustalW [14]. Для определения наличия мутаций лекарственной устойчивости ВГС к ПППД использовали программное обеспечение Geno2pheno HCV resistance (<https://hcv.geno2pheno.org>).

Статистическую обработку данных производили с помощью пакета программ MS Excel, Prizm 9.5.1 (GraphPad Software Inc.). При оценке статистической погрешности использовали «точный» интервал Клоппера–Пирсона. Результаты представлены с указанием 95% доверительного интервала (95% ДИ).

Результаты

Возраст пациентов варьировал от 18 до 65 лет и составил в среднем $34,3 \pm 7,27$ лет. Количество мужчин в группе превышало количество женщин — 70,7 и 29,3%, соответственно.

В нашем исследовании антитела к ВГС были выявлены у 94,27% (95% ДИ: 89,40–97,35%) ВИЧ-инфицированных лиц. Из них женщин — 44 человека (29,73%) (95% ДИ: 22,50–37,79%) и мужчин — 104 человека (70,27%) (95% ДИ: 62,21–77,50%).

РНК ВГС выявили у 98 (62,4%) (95% ДИ: 54,35–70,01%) пациентов. Распределение генотипов ВГС в данной группе было следующим: 1a — 7,14% (95% ДИ: 2,92–14,16%) (n = 7), 1b — 53,06% (95% ДИ: 42,71–63,22%) (n = 52), 2 —

2,04% (95% ДИ: 0,25–7,18%) (n = 2), 3a — 37,76% (95% ДИ: 28,16–48,12%) (n = 37).

Результаты определения вирусной нагрузки варьировали от $5,3 \times 10^3$ до $2,3 \times 10^8$ МЕ/мл. Нуклеотидная последовательность всех трех участков NS3, NS5A, NS5B определена в 73 образцах, у 9 образцов удалось амплифицировать и получить нуклеотидные последовательности двух регионов и у 15 образцов — одного региона.

Частота выявления мутаций резистентности в регионе NS3. Анализ мутаций лекарственной устойчивости в регионе NS3 проводили для 82 изолятов ВГС генотипов 1b (n = 46), 3a (n = 31), 1a (n = 4), 2 (n = 1). Процентное соотношение последовательностей региона NS3 ВГС генотипов 1b, 3a, 1a, 2 в обследованной выборке составило 56,10% (95% ДИ: 44,70–67,04%), 37,80% (95% ДИ: 27,32–49,19%), 4,88% (95% ДИ: 1,34–12,03%), 1,22% (95% ДИ: 0,03–6,61%) соответственно. Полученные показатели частоты встречаемости в зависимости от генотипа представлены в табл. 1.

В общей сложности доля штаммов, содержащих мутации в регионе NS3, составила 9,8% (95% ДИ: 4,31–18,32%) (8/82). Всего содержали мутации 50% (95% ДИ: 6,76–93,24%) (2/4) последовательностей генотипа 1a, 8,7% (95% ДИ: 2,42–20,79%) (4/46) генотипа 1b, 6,5% (95% ДИ: 0,79–21,42%) (2/31) генотипа 3a.

Частота выявления мутаций резистентности в регионе NS5A. Анализ мутаций лекарственной устойчивости в регионе NS5A проводили для 83 изолятов ВГС генотипов 1b (n = 47), 3a (n = 30), 1a (n = 6).

Процентное соотношение последовательностей региона NS5A ВГС генотипов 1b, 3a, 1a среди обследованных составило 56,6% (95% ДИ: 45,29–67,47%), 36,2% (95% ДИ: 25,88–47,43%), 7,2% (95% ДИ: 2,70–15,07%) соответственно. Частота встре-

Таблица 1. Частота выявления клинически значимых мутаций в регионе NS3 в исследуемой группе

Table 1. Frequency of detected clinically relevant mutations in HCV NS3 region in the study group

Генотип ВГС/количество последовательностей HCV genotype/number of sequences	Мутация Mutation	n	%	Устойчивость к ингибитору Resistance to inhibitor
1a (4)	T54S	1	25	Телапревир, Воксилапревир, Гразопревир Telaprevir, Voxilaprevir, Grazoprevir
	Q80L	1	25	Воксилапревир Voxilaprevir
1b (46)	V36M	1	2,2	Гразопревир, Воксилапревир Grazoprevir, Voxilaprevir
	Y56F	2	4,4	Гразопревир, Воксилапревир Grazoprevir, Voxilaprevir
	Q80K	1	2,2	Асунапревир, Симепревир Asunaprevir, Simeprevir
3a (31)	Q80K	1	3,2	Воксилапревир Voxilaprevir
	Q168R	1	3,2	Глекапревир, Воксилапревир Glecaprevir, Voxilaprevir

чаемости мутаций лекарственной устойчивости ВГС в регионе NS5A представлена в табл. 2 в соответствии с генотипом вируса.

Доля фармакорезистентных по указанному региону штаммов составила 19,3% (95% ДИ: 11,44%–29,41%) (16/83). Всего содержали мутации устойчивости 14,9% (95% ДИ: 6,20–28,31%) (7/47) последовательностей генотипа 1b, 33,3% (95% ДИ: 14,73–49,40%) (9/30) генотипа 3a.

Частота выявления мутаций резистентности в регионе NS5B. Анализ мутаций лекарственной устойчивости в регионе NS5B проводили для 87 изолятов ВГС генотипов 1b (n = 48), 3a (n = 32), 2 (n = 2), 1a (n = 5).

Процентное соотношение последовательностей региона NS5B ВГС генотипов 1b, 3a, 2, 1a в обследованной выборке составило 55,2% (95% ДИ: 44,13–65,85%), 36,8% (95% ДИ: 26,69–47,80%), 2,3% (95% ДИ: 0,28–8,06%), 5,7% (95% ДИ: 1,89–12,90%) соответственно. В табл. 3 представлены данные о штаммах ВГС с мутациями в NS5B-регионе.

Клинически значимые аминокислотные замены были выявлены в 10 штаммах из 87, что составило 11,5% (95% ДИ: 5,65%–20,12%). Всего содержали мутации 60% (95% ДИ: 14,66–94,73%) (3/5) последовательностей генотипа 1a, 8,3% (95% ДИ: 2,32–19,98%) (4/48) генотипа 1b, 9,4% (95% ДИ: 1,98–25,02%) (3/32) генотипа 3a.

В обследованной нами группе мутации, ассоциированные с устойчивостью ВГС к ПППД во всех регионах, были обнаружены в 16,6% (95% ДИ: 11,11–23,32%) случаев (n = 26). В регионе NS3 — 6 значимых нуклеотидных замен, в регионах NS5A и NS5B 15 и 10 значимых нуклеотидных замен соответственно (табл. 4).

Обсуждение

По данным литературы, частота выявления серологических маркеров инфекции у мужчин значительно выше, чем у женщин, как среди ВИЧ-инфицированного контингента, так и среди больных ХГС [17]. В нашем исследовании среди пациентов с коинфекцией ВИЧ+ВГС серологические маркеры обеих инфекций преобладали у мужчин по сравнению с женщинами.

Распространение генотипов ВГС в РФ распределяется следующим образом: генотип 1 — 52,6% (1b — 48,9%, 1a — 3,7%); генотип 3 — 39,6%; генотип 2 — 7,8%. Генотипы 4–6 встречаются менее чем в 0,01% случаев [9]. Что касается генетического разнообразия ВГС среди ВИЧ-инфицированных лиц, оно аналогично таковому в общей популяции — преобладают генотипы 1b и 3a [3]. Распределение генотипов ВГС среди ВИЧ-инфицированных лиц, полученное в на-

Таблица 2. Частота выявления клинически значимых мутаций в регионе NS5A в исследуемой группе

Table 2. Frequency of detected clinically relevant mutations in HCV NS5A region in the study group

Генотип ВГС/количество последовательностей HCV genotype/number of sequences	Мутация Mutation	n	%	Устойчивость к ингибитору Resistance to inhibitor
1b (47)	Y93H	7	14,9	Даклатасвир, Омбитасвир, Пибрентасвир Daclatasvir, Ombitasvir, Pibrentasvir
3a (30)	A30K	2	6,7	Даклатасвир, Пибрентасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Pibrentasvir, Ledipasvir
	Y93H	7	42,6	Даклатасвир, Омбитасвир, Пибрентасвир Daclatasvir, Ombitasvir, Pibrentasvir

Таблица 3. Частота выявления клинически значимых мутаций в регионе NS5B в исследуемой группе

Table 3. Frequency of detected clinically relevant mutations in HCV NS5B region in the study group

Генотип ВГС/количество последовательностей HCV genotype/number of sequences	Мутация Mutation	n	%	Устойчивость к ингибитору Resistance to inhibitor
1a (5)	L159F	2	40	Софосбувир, Дасабувир Sofosbuvir, Dasabuvir
	C316Y	1	20	Дасабувир Dasabuvir
1b (48)	C316N	3	6,25	Софосбувир Sofosbuvir
	L159F	1	2,1	Дасабувир Dasabuvir
3a (32)	S282T	3	9,4	Дасабувир Dasabuvir

Таблица 4. Значимые нуклеотидные замены у ВИЧ-инфицированных пациентов с неэффективной АРВТ
 Table 4. Significant nucleotide substitutions in HIV-infected patients with ineffective ART

№ образца No. of sample	Регион Region	Генотип Genotype	Нуклеотидная замена Nucleotide substitution	Устойчивость к ингибитору Resistance to Inhibitor
3	NS5A	3a	A30K+Y93H	Даклатасвир, Ледипасвир, Омбитасвир Daclatasvir, Ledipasvir, Ombitasvir
6	NS5A	1b	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
6	NS3	1b	V36M	Боцепревир, Глекапревир, Гразопревир Boceprevir, Glecaprevir, Grazoprevir
7	NS3	1b	Y56F	Гразопревир Grazoprevir
8	NS5A	3a	A30K	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
11	NS5B	1b	C316N	Софосбувир Sofosbuvir
15	NS5A	3a	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
15	NS3	3a	Q168R	Глекапревир, Воксилапревир Glecaprevir, Voxilaprevir
18	NS5B	1b	C316Y	Софосбувир Sofosbuvir
23	NS5A	1b	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
25	NS5A	1b	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
26	NS5B	1b	C316N	Софосбувир Sofosbuvir
29	NS3	3a	Q80K	Воксилапревир Voxilaprevir
29	NS5A	3a	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
29	NS5B	3a	S282T	Софосбувир Sofosbuvir
35	NS5B	1b	L159F	Софосбувир Sofosbuvir
36	NS5A	3a	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
39	NS5B	1a	L159F	Софосбувир Sofosbuvir
42	NS3	1b	Y56F+Q80K	Гразопревир Grazoprevir
44	NS5A	3a	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
46	NS5A	1b	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
57	NS5B	3a	S282T	Софосбувир Sofosbuvir
57	NS5A	3a	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
71	NS5A	1b	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
72	NS5B	3a	S282T	Софосбувир Sofosbuvir

Окончание таблицы 4. Значимые нуклеотидные замены у ВИЧ-инфицированных пациентов с неэффективной АРВТ

Table 4. Significant nucleotide substitutions in HIV-infected patients with ineffective ART (continued)

№ образца No. of sample	Регион Region	Генотип Genotype	Нуклеотидная замена Nucleotide substitution	Устойчивость к ингибитору Resistance to Inhibitor
75	NS5B	1a	L159F	Софосбувир Sofosbuvir
75	NS3	1a	T54S+Q80L	Боцепревир, Телапревир Boceprevir, Telaprevir
81	NS5A	1b	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
86	NS3	3a	Q80K	Воксилапревир Voxilaprevir
89	NS5A	3a	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
91	NS5B	1a	C316Y	Софосбувир Sofosbuvir
94	NS5A	1b	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir

стоящей работе, — превалирование генотипов 1b и 3a — не противоречило литературным данным.

Люди с коинфекцией ВГС+ВИЧ обладают высокой вероятностью передачи ВГС половым путем. С коинфицированием связаны повышенная восприимчивость слизистых оболочек к инфицированию ВГС. Прогрессирование заболеваний печени, фиброза и цирроза так же связаны с одновременным инфицированием ВГС и ВИЧ, что является одной из наиболее распространенных причин смерти у людей, живущих с ВИЧ-инфекцией (ЛЖВ), получающих АРВТ, и, в целом, смертность при коинфекции ВИЧ+ВГС выше, чем при моноинфекциях ВГС или ВИЧ [15].

В отсутствие специфической вакцинопрофилактики ХГС важным элементом стратегий элиминации вируса является своевременное назначение терапии пациентам с высоким риском передачи инфекции. Таким образом, к группам, в которых представляется возможной микроэлиминация ВГС, относятся ЛЖВ.

На данный момент существуют пангенотипные схемы терапии ХГС, однако, в связи с их высокой стоимостью, актуальными продолжают оставаться генотип-специфичные лекарственные средства. Таким образом ключевыми детерминантами выбора схем терапии ПППД остаются генотип ВГС, субтип и наличие ассоциированных с фармакорезистентностью мутаций, в связи с чем отсутствие определения генотипа и несвоевременное выявление мутаций лекарственной устойчивости могут привести к выбору неоптимальных схем лечения и, как следствие, неудачному исходу терапии [16]. В связи с этим особое значение приобретает определение генотипов, субтипов и мутаций ВГС в значимых для распространения

вируса внутри страны группах риска, в том числе и среди ВИЧ-инфицированных лиц.

В настоящее время терапевтические схемы на основе ПППД обеспечивают элиминацию вируса у большинства пациентов с ХГС. Тем не менее у 5% пациентов наблюдается вирусологический прорыв на терапии, что обычно связано с наличием мутаций лекарственной устойчивости. У пациентов с неэффективностью ПППД наличие таких мутаций ставит под угрозу эффективность терапии второй линии и, следовательно, является предиктором дальнейшего неуспешного лечения.

В данном исследовании мы проанализировали нуклеотидные последовательности регионов NS3, NS5A, NS5B на предмет наличия мутаций лекарственной устойчивости. Секвенирование всех трех регионов среди РНК-положительных образцов удалось в 75% случаев, двух и одного регионов — в 9,2 и 15,5% соответственно. Неудачи амплификации, по-видимому, были обусловлены более высоким уровнем полиморфизма последовательностей, кодирующих целевые белки, по сравнению с 5'-НТО областью, использовавшейся для детекции инфекции, и участком NS5B, использовавшимся для определения генотипа ВГС.

У 26 (16,6%) пациентов была обнаружена по крайней мере одна мутация в одном из трех регионов вируса, связанная с устойчивостью к терапии ПППД, у 4 пациентов были обнаружены мутации одновременно в двух регионах и у одного пациента — в трех регионах. У 3 пациентов была выявлена фармакорезистентность к препаратам, обусловленная наличием сразу двух мутаций в одном регионе: у двух пациентов в регионе NS3 и у одного — в регионе NS5A.

При определении наличия мутаций лекарственной устойчивости ВГС к ПППД в регионе NS5B среди впервые выявленных ВИЧ-инфицированных лиц значимые аминокислотные замены были обнаружены в 4,6% случаев [3]. В нашем исследовании это показатель составил 11,5%. Отсутствие эффективности АРВТ среди ЛЖВ может быть связано не только с низким уровнем комплаенса таких пациентов, но и продолжением практики рискованного поведения, в том числе употреблением наркотических средств. У таких пациентов велик риск передачи первично резистентных штаммов ВГС из-за использования нестерильных медицинских средств и отсутствия контрацепции.

Среди ЛЖВ с неэффективной АРВТ проблема резистентности ВГС имеет наиболее выраженный характер. Наряду с продолжением снижения уровня иммунной защиты в результате воздействия устойчивого штамма ВИЧ, состояние пациента усугубляется воздействием ВГС, в частности снижая функциональность печени. Такое коморбидное состояние без дальнейшего лечения неминуемо ведет к необратимым последствиям в виде декомпенсации печени и преждевременной гибели пациентов.

Стоит отметить, что штаммы ВГС с мутацией Y93H в регионе NS5A способны сохраняться длительное время в виде минорных даже после прекращения лечения ПППД [13]. Это важно в разрезе возможности передачи устойчивых штаммов ВГС среди групп пациентов с высоким риском передачи инфекции, в частности у ЛЖВ. Важный вопрос заключается в том, возможно ли эффективно лечить таких пациентов повторно препаратами более высокого класса при условии, что эти препараты доступны.

В настоящее время продолжается изучение влияния полиморфных вариантов, на данный момент не имеющих доказательств прямого

влияния на фитнес вируса в условиях терапии, однако оказывающих синергетическое действие при их комбинации.

Заключение

Несмотря на успехи терапии ХГС, лекарственная устойчивость практически неизбежна у пациентов, которые на терапии не достигают УВО. Еще более актуальной данная проблема становится при рассмотрении возможности передачи штаммов с уже сформированной лекарственной устойчивостью в уязвимых группах, а именно у пациентов с ВИЧ-инфекцией. Данная ситуация усугубляет существующие проблемы с лечением и достижением полной эрадикации вируса наряду с возможной его устойчивостью к препаратам, что может привести к инвалидизации и преждевременной смерти таких пациентов.

Молекулярно-генетическая характеристика последовательностей ВГС будет способствовать последующей идентификации путей передачи патогена с целью контроля и/или предотвращения распространения инфекции. Полученные данные рационально использовать для оценки динамики распространенности фармакорезистентности ВГС среди ВИЧ-инфицированных лиц.

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Авторы подтверждают, что от всех участников исследования было получено информированное согласие.

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

Список литературы/References

1. Загдын З.М., Кобесов Н.В., Вербицкая Е.В., Денюшенков В.Л. Глобальное бремя ВИЧ/СПИД в России в аспекте общественного здоровья. Часть 1 // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2023. Т. 15, № 2. С. 69–80. [Zagdyn Z.M., Kobesov N.V., Verbitskaya E.V., Denuyshenkov V.L. The global burden of HIV/AIDS in Russia in terms of public health. Part 1. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2023, vol. 15, no. 2, pp. 69–80. (In Russ.)] doi: 10.22328/2077-9828-2023-15-2-69-80
2. Мукомолов С.Л., Левакова И.А. Эпидемиологическая характеристика хронических вирусных гепатитов в Российской Федерации в 1999–2009 гг. // Инфекция и иммунитет. 2011. Т. 1, № 3. С. 255–262. [Mukomolov S.L., Levakova I.A. Epidemiological characteristics of chronic viral hepatitis in the Russian Federation in 1999–2009. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2011, vol. 1, no. 3, pp. 255–262. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2011-3-255-262
3. Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Voumbaly S., Balde T.A., Семенов А.В. Первичные мутации лекарственной устойчивости вируса гепатита С у пациентов с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией // Проблемы особо опасных инфекций. 2020. № 3. С. 97–105. [Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Zueva E.B., Serikova E.N., Shchemelev A.N., Voumbaly S., Balde T.A., Semenov A.V. Primary HCV drug resistance mutations in patients with newly diagnosed HIV infection. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2020, no. 3, pp. 97–105. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2020-3-97-105
4. Соболева Н.В., Карлсен А.А., Кожанова Т.В., Кичатова В.С., Клущкина В.В., Исаева О.В., Игнатьева М.Е., Романенко В.В., Ооржак Н.Д., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Распространенность вируса гепатита С среди условно здорового населения Российской Федерации // Журнал инфектологии. 2017. Т. 9, № 2. С. 56–64. [Soboleva N.V., Karlsen A.A., Kozhanova T.V., Kichatova V.S., Klushkina V.V., Isaeva O.V., Ignatieva M.E., Romanenko V.V., Oorzhak N.D., Malinnikova E.Yu., Kyuregyan K.K., Михайлов М.И. Распространенность вируса гепатита С среди условно здорового населения Российской Федерации // *Журнал инфектологии*. 2017. Т. 9, № 2. С. 56–64.

- Oorzhak N.D., Malinnikova E.Yu., Kuregyan K.K., Mikhailov M.I. The prevalence of the hepatitis C virus among the conditionally healthy population of the Russian Federation. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2017, vol. 9, no. 2, pp. 56–64. (In Russ.) doi: 10.22625/2072-6732-2017-9-2-56-64
5. Инфекционные болезни: национальное руководство. Под ред. Н.Д. Ющука, Ю.Я. Венгерова. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 1104 с. [Infectious diseases: national guidelines. Eds. Yushchuk N.D., Vengerov Yu.Ya. Moscow: GEOTAR-Media, 2019. 1104 p. (In Russ.)]
 6. Aghemo A., De Francesco R. New horizons in hepatitis C antiviral therapy with direct-acting antivirals. *Hepatology*, 2013, vol. 58, no. 1, pp. 428–438. doi: 10.1002/hep.26371
 7. Borgia S.M., Hedskog C., Parhy B., Hyland R.H., Stamm L.M., Brainard D.M., Subramanian M.G., McHutchison J.G., Mo H., Svarovskaia E., Shafraan S.D. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. *J. Infect Dis.*, 2018, vol. 218, no. 11, pp. 1722–1729. doi: 10.1093/infdis/jiy401
 8. Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., Smith C., Marinos G., Gonçalves F.L. Jr., Häussinger D., Diago M., Carosi G., Dhumeaux D., Craxi A., Lin A., Hoffman J., Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.*, 2002, vol. 347, no. 13, pp. 975–982. doi: 10.1056/NEJMoa020047
 9. Gower E., Estes C., Blach S., Razavi-Shearer K., Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, 2014, vol. 1, suppl. 1, pp. S45–S57. doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.027
 10. Guntipalli P., Pakala R., Kumari Gara S., Ahmed F., Bhatnagar A., Endaya Coronel M.K., Razzack A.A., Solimando A.G., Thompson A., Andrews K., Enebong Nya G., Ahmad S., Rinaldo R., Cozzolongo R., Shahini E. Worldwide prevalence, genotype distribution and management of hepatitis C. *Acta Gastroenterol. Belg.*, 2021, vol. 84, no. 4, pp. 637–656. doi: 10.51821/84.4.015
 11. Messina J.P., Humphreys I., Flaxman A., Brown A., Cooke G.S., Pybus O.G., Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 2015, vol. 61, no. 1, pp. 77–87. doi: 10.1002/hep.27259
 12. Ngwaga T., Kong L., Lin D., Schoborg C., Taylor L.E., Mayer K.H., Klein R.S., Celentano D.D., Sobel J.D., Jamieson D.J., King C.C., Tavis J.E., Blackard J.T. Diversity of the hepatitis C virus NS5B gene during HIV co-infection. *PLoS One*, 2020, vol. 15: e0237162. doi: 10.1371/journal.pone.0237162
 13. Nitta S., Asahina Y., Matsuda M., Yamada N., Sugiyama R., Masaki T., Suzuki R., Kato N., Watanabe M., Wakita T., Kato T. Effects of resistance-associated NS5A mutations in hepatitis C virus on viral production and susceptibility to antiviral reagents. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6: 34652. doi: 10.1038/srep34652
 14. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.*, 2021, vol. 38, no. 7, pp. 3022–3027. doi: 10.1093/molbev/msab120
 15. Thompson A.J., McHutchison J.G. Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). *J. Viral. Hepat.*, 2009, vol. 16, pp. 377–387. doi: 10.1111/j.1365-2893.2009.01124
 16. Welzel T.M., Bhardwaj N., Hedskog C., Chodavarapu K., Camus G., McNally J., Brainard D., Miller M.D., Mo H., Svarovskaia E., Jacobson I., Zeuzem S., Agarwal K. Global epidemiology of HCV subtypes and resistance-associated substitutions evaluated by sequencing-based subtype analyses. *J. Hepatol.*, 2017, vol. 67, no. 2, pp. 224–236. doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.014
 17. WHO. Global health sector strategy on viral hepatitis, 2016–2021: towards ending viral hepatitis. Geneva: WHO Document Production Services, 2016. 53 p. URL: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246177/1/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf> (15.07.2023)

Авторы:

Рейнгардт Д.Э., врач клинической лабораторной диагностики отделения ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний 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;
Ануфриева Е.В., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Семенов А.В., д.б.н., директор ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;
Лялина Л.В., д.м.н., профессор, зав. лабораторией эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;
Тотоян 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 Первого Санкт-Петербургского медицинского университета имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Reingardt D.E., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostic, Department of Diagnostics of HIV Infection and AIDS-related Diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Virology HIV-Infection; Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Anufrieva E.V., Junior Researcher, Laboratory of Immunology and Virology HIV-Infection; Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Semenov A.V., DSc (Biology), Director of the Federal Research Institute of Viral Infections "ViroM", Ekaterinburg, Russian Federation;
Lyalina L.V., DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Epidemiology of Infectious and Non-Infectious Diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfection, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;
Totolian A.A., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Director of 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.

CHARACTERISTICS OF CHILDREN LIVING WITH HIV IN A REFERRAL CENTER IN IRAN: A CROSS-SECTIONAL STUDY

M. Hassannezhad^a, M.R. Abdolsalehi^b, S.A.D. Manshadi^a, S.M. Asadi^a, E. Shahmohamadi^a, F. Abbaspour^a, S. Jahani^a, S. SeyedAlinaghi^a

^a Iranian Research Center for HIV/AIDS, Iranian Institute for Reduction of High-Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^b Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract. *Background.* With an estimated 38.4 million people worldwide living with HIV in 2021, including 2.73 million children, there is a pressing need to understand and address HIV transmission and its impact on children's health. This study aims to describe the demographic characteristics, clinical profiles, and outcomes of Iranian children living with HIV referred to one of the largest center for counseling HIV patients in Iran. *Materials and methods.* In this descriptive cross-sectional study, we assessed clinical and biological markers in HIV-infected children treated at the counseling center for behavioral diseases in a referral Hospital in Tehran. The study included a total of 60 records of children and adolescents under the age of 18, spanning from 2004 to 2020. We collected detailed clinical and laboratory data, including demographic information, treatment history, comorbidities, opportunistic infections, adherence to treatment, side effects of HIV treatment, and laboratory test results. Additionally, the study investigated any history of COVID-19 infection during the follow-up period, which coincided with the pandemic. *Results.* Out of the 60 patients included in the study, there were 23 females (38.3%) and 37 males (61.6%), with a mean age of 10.03 years. About 16.7% of patients had at least one comorbidity, including epilepsy, ADHD, autoimmune hepatitis, ITP, allergic asthma, alopecia areata, and cystic fibrosis. Among the mothers of these children, 93.9% were HIV-positive. Out of the 60 mothers, 6.7% were not infected with the virus, 60% were receiving treatment, and 10% had passed away. Treatment adherence was acceptable in 93.3% of patients. Opportunistic infectious diseases were experienced by 36.7% of patients, with oral candidiasis being the most common. Hospitalizations occurred in 21 patients, primarily due to pneumonia, fever, weakness, lethargy, and oral thrush. *Conclusions.* Investigating the demographic, clinical profile, and long-term outcomes of pediatric HIV is crucial for policymakers to effectively address the ongoing HIV epidemic. Given the significant knowledge gap on pediatric HIV in Iran, further studies in this area are necessary to improve understanding and inform strategies for the prevention, management, and treatment of HIV in children in the country.

Key words: HIV, pediatric care, adolescents, HIV infection, antiviral therapy, Iran.

Адрес для переписки:

Сейед Ахмад СейедАлиаги
1419733141, Иран, Тегеран, бульвар Кешаварз,
Иранский исследовательский центр ВИЧ/СПИД,
Иранский институт снижения поведения высокого риска,
Тегеранский университет медицинских наук.
Тел./факс: +98 21 66947984.
E-mail: s_a_alinaghi@yahoo.com

Contacts:

Seyed Ahmad SeyedAlinaghi
1419733141, Iran, Tehran, Keshavarz Blvd.,
Iranian Research Center for HIV/AIDS, Iranian Institute for Reduction
of High-Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences.
Phone/fax: +98 21 66947984.
E-mail: s_a_alinaghi@yahoo.com

Для цитирования:

Хасаннежад М., Абдольсалехи М.Р., Маншади С.А.Д., Асади С.М.,
Шахмохамеди Э., Аббаспур Ф., Джахани Ш., СейедАлиаги С.
Характеристика детей, живущих с ВИЧ в Иране, по данным
специализированной клиники: поперечное исследование //
Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 95–102. doi: 10.15789/2220-
7619-COC-15626

Citation:

Hassannezhad M., Abdolsalehi M.R., Manshadi S.A.D., Asadi S.M.,
Shahmohamadi E., Abbaspour F., Jahani S., SeyedAlinaghi S. Characteristics
of children living with HIV in a referral center in Iran: a cross-sectional study //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024,
vol. 14, no. 1, pp. 95–102. doi: 10.15789/2220-7619-COC-15626

ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕЙ, ЖИВУЩИХ С ВИЧ В ИРАНЕ, ПО ДАННЫМ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ КЛИНИКИ: ПОПЕРЕЧНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Хасаннежад М.¹, Абдолсалеми М.Р.², Маншади С.А.Д.¹, Асади С.М.¹, Шахмохамади Э.¹, Аббаспур Ф.¹, Джахани Ш.¹, СейедАлиаги С.¹

¹ Иранский исследовательский центр ВИЧ/СПИД, Иранский институт снижения поведения высокого риска, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

² Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

Резюме. *История вопроса.* Учитывая, что в 2021 г. во всем мире по приблизительным оценкам будет насчитываться 38,4 млн человек, живущих с ВИЧ, включая 2,73 млн детей, существует острая необходимость решения проблемы передачи ВИЧ и изучения влияния ВИЧ-инфекции на здоровье детей. Целью данного исследования является описание демографических характеристик, клинических профилей и результатов лечения иранских детей, живущих с ВИЧ, направленных в один из крупнейших центров консультирования пациентов с ВИЧ в Иране. *Материалы и методы.* В настоящем описательном поперечном исследовании мы оценили клинические и биологические маркеры у ВИЧ-инфицированных детей, находящихся на лечении в консультационном центре по поведенческим заболеваниям специализированной больницы в Тегеране. В исследование включено в общей сложности 60 записей о детях и подростках в возрасте до 18 лет с 2004 по 2020 г. Мы собрали подробные клинические и лабораторные данные, включая демографические сведения, историю лечения, сопутствующие заболевания, оппортунистические инфекции, приверженность лечению, побочные эффекты от лечения ВИЧ и результаты лабораторных исследований. Кроме того, в ходе исследования изучалась любая история заражения COVID-19 в течение периода наблюдения, который совпадал с пандемией. *Результаты.* В исследование было включено 60 пациентов, в том числе 23 ребенка женского пола (38,3%) и 37 – мужского пола (61,6%); средний возраст 10,03 года. Около 16,7% пациентов имели по крайней мере одно сопутствующее заболевание, включая эпилепсию, СДВГ, аутоиммунный гепатит, идиопатическая тромбоцитопеническую пурпуру, аллергическую астму, очаговую алопецию и муковисцидоз. Среди матерей таких детей 93,9% оказались ВИЧ-положительными. Из 60 матерей 6,7% не были инфицированы вирусом, 60% получали лечение, а 10% скончались. Приверженность лечению была приемлемой у 93,3% пациентов. Оппортунистические инфекционные заболевания наблюдались у 36,7% пациентов, наиболее часто встречался кандидоз полости рта. Госпитализация имела место в анамнезе у 21 пациента, основными ее причинами были пневмония, лихорадка, слабость, летаргия и молочница полости рта. *Вывод.* Исследование демографического, клинического профиля и долгосрочных последствий ВИЧ-инфекции у детей имеет решающее значение для эффективного противодействия продолжающейся эпидемии ВИЧ. Учитывая значительный пробел в знаниях о ВИЧ у детей в Иране, необходимы дальнейшие исследования в этой области для улучшения понимания и обоснования стратегий профилактики, ведения и лечения ВИЧ у детей.

Ключевые слова: ВИЧ, педиатрическая помощь, подростки, ВИЧ-инфекции, противовирусная терапия, Иран.

Introduction

In 2021, an estimated 38.4 million people worldwide were living with HIV, of which 2.73 million were children aged 0–19. Approximately 850 children were being infected daily. In Iran, according to UNAIDS, 59 314 people were living with HIV in 2019 of which 862 were children under 15 years. Additionally, the country experiences around 4100 new infections and 2500 AIDS-related deaths each year [25, 27].

HIV transmission from a mother to her child can occur during pregnancy, childbirth, or breastfeeding, referred to as perinatal transmission [21]. The majority of children with HIV infection acquire it through perinatal transmission or by breastfeeding during their early years of immune, neuro-cognitive, and physical development. Adolescents who contract HIV typically acquire it through sexual transmission [6].

The most typical symptoms and signs of HIV in children include recurrent upper respiratory tract infections, lymphadenopathy, and skin manifestations.

Furthermore, children with HIV are more susceptible to various opportunistic infections such as tuberculosis, bacterial pneumonia, diarrhea, oral candidiasis, and Kaposi's sarcoma [20]. Opportunistic infections are a major contributor to both illness and death in individuals with HIV. Although antiretroviral therapy (ART) has reduced the occurrence of opportunistic infections, it still contributes to hospitalizations and deaths in those with HIV. Thus, preventing opportunistic infections in those with HIV is crucial in reducing disease burden and associated mortality [24].

ART enables individuals with HIV to have a life expectancy similar to the general population and has a significant impact on controlling the progression of HIV disease. However, it can also result in various complications, such as metabolic syndrome, dyslipidemia, cardiovascular disease, osteoporosis, and renal disease. In the absence of ART, children with HIV may face growth and puberty delays, long-term immune dysfunction, neuro-developmental delays, and other chronic complications of HIV infection [11].

The lack of comprehensive HIV statistics for children in Iran is a significant concern that hampers efforts to address and combat the virus's impact on this vulnerable population. Despite the growing number of HIV cases among children in the country, limited research and data collection efforts have been directed toward understanding the scale and dynamics of this issue [18]. Without accurate statistics, it becomes difficult to design effective prevention and treatment strategies tailored to the specific needs of children living with HIV in Iran. To address the significant burden of HIV disease in Iran, particularly in Iranian children, we embarked on a study to explore the demographic characteristics, clinical profile, and outcomes of children living with HIV referred to the behavioral disease counseling center of Imam Khomeini Hospital, Iran. This research endeavor was prompted by the scarcity of studies conducted in this specific population.

Materials and methods

Study design and participants. We conducted a retrospective cross-sectional study to describe the demographic characteristics, clinical and biological markers, as well as the complications in HIV infected children referred to the counseling center for behavioral diseases in a referral Hospital in Tehran.

The study population consisted of all children under the age of 18 who received treatment for HIV from 2004 to 2020. Inclusion criteria included all available files of children and adolescents younger than 18 years old with HIV from the archives of the counseling center. Patients with incomplete records were excluded from the study. A total of 60 records were assessed and entered into the study.

Data collection and variables. The study extracted detailed clinical and laboratory information from patients' records using a structured form, which was based on previous research [1, 5]. The form captured data including demographic information (sex, current age, age at diagnosis, height and weight), immunization history, treatment history for HIV, history of maternal infection and treatment, and comorbidities (such as cancers, renal, cardiovascular, dermatologic, metabolic and neurological disorders). Opportunistic infections included any history of infections that exploit an unnatural opportunity to induce diseases such as a compromised immune system including pneumonia, candidiasis, Tuberculosis (TB), cytomegalovirus (CMV), and herpes simplex virus (HSV) [20].

Adherence to treatment was defined, based on previous studies, as the patient consistently attended scheduled visits and followed the prescribed medication regimen over the past year [12]. History of treatment failures was defined as a viral load of > 200 copies/ml after 6 months of treatment [4]. Moreover, we assessed for any side effects of HIV treatment (such as allergic reactions — nausea/vom-

iting, loss of appetite, fatigue, lipodystrophy, mood changes, and dermatological disorders).

Laboratory test results included the initial and final CD4 count, HBS Ag — anti-HBS Ab (ELIZA), HCV Ab (DiaSorin, Spain), CMV Ab (IgM, IgG), PPD test, toxoplasma Ab (standard ELIZA), blood sugar, creatinine and hemoglobin levels, and lipid profile.

In addition, as the patients' follow-up took place during the COVID-19 pandemic, we investigated any history of COVID-19 infection in the study population.

Ethical considerations. The study received ethical approval from the Ethic Committee of Tehran University of Medical Science (The ethic code. IR.TUMS.IKHC.REC.1398.037). To protect participant confidentiality, personal identifying information was not collected and each participant was assigned a unique identification number. This study was observational and did not interfere with patients' routine treatments.

Statistical analysis. The data analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS) version 26.0. Quantitative variables were described using measures of central tendency such as mean, and standard deviation, while qualitative variables were summarized using absolute frequency and percentage. The results were presented in tables.

Results

There were 23 female patients (38.3%) and 37 male patients (61.6%) with a mean age of 10.03 years and a standard deviation of 4.60. The youngest patient was one-year-old and the oldest was 18 years. Fifty-one patients were under family care (85%), six patients were receiving healthcare assistance (10%), and three patients were under guardianship (5%). Ten patients had at least one comorbidity (16.7%). Specifically, amongst those diagnosed with comorbidities, there were two cases of epilepsy (3.3%), two cases of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) (3.3%), one case each of autoimmune hepatitis (1.7%), ITP (1.7%), allergic asthma (1.7%), alopecia areata (1.7%), and cystic fibrosis (1.7%).

Fifty-six children were born from HIV-positive mothers (93.9%). Among the remaining four children who were born from healthy mothers, two didn't have any identified risk factors, one had received a blood transfusion after inguinal surgery and the last one had been a victim of rape.

Out of 60 mothers of these children, four (6.7%) mothers are not infected with the virus, 36 mothers (60%) were receiving treatment, six (10%) mothers had passed away while there is no information regarding the status of other seven mothers (11.7%).

Fifty-six patients (93.3%) had an acceptable adherence to treatment and had regular visits to the clinic as required. Out of four patients who were not committed to treatment, three guardians were

identified as addicts and the fourth child had lost his mother and was under the supervision of the welfare system and had regular visits but ever since he has been under the guardianship of a family he had not visited for check-ups. Patients' characteristics were listed in Table 1.

Twenty-two patients (28.37%) had experienced at least one episode of opportunistic infectious disease during their illness, including oral candidiasis (20%), herpetic lesions (5%), and varicella zoster (3.33%). In addition to these, there was one occurrence of each

of the following diseases: *Candida vaginitis*, molluscum contagiosum, vaginitis, urinary infection with *Enterobacter*, and warts on the lower limbs. Recurrent otitis was observed in 3.33% of patients. Twenty-one patients were hospitalized at least once with the following presentations and symptoms: Seven patients (11.6%) had fever, weakness, lethargy, and Oral thrush, seven patients were (11.6%) hospitalized due to pneumonia, two patients (3.33%) had seizures and at least one patient experienced one of the following conditions: asthma attack (1.66%), diarrhea (1.66%), herpes zoster (1.66%), syncope (suspected seizure) (1.66%), TB (1.66%), to receive cell pack (1.66%), ear surgery (1.66%), lethargy (1.66%), petechiae and epistaxis (1.66%), shingles (1.66%), encephalopathy (1.66%), Stevens–Johnson syndrome (1.66%) and inguinal hernia surgery (1.66%).

Patients records were screened for possible coinfections and the results are as follows: Out of 18 patients with PPD records, only two patients exhibited positive PPD with dimensions of 16mm and 6mm while others tested negative. The result of the other virus's immunoglobulin screening is documented in Table 1. Also, the initial and final treatment regime of patients is listed in Table 2 and 3. A summary of ART side effects, and regime change causes is available in Tables 4, 5 respectively.

None of the included patients reported prior infection with COVID-19. Two children passed away between 2004–2020. One was under foster care, and the guardians were unaware of the child's medical condition, which resulted in a lack of treatment. The second case was a known case of TB and Cystic Fibrosis, who was hospitalized due to pneumonia and passed away subsequently.

Discussion

This study aimed to investigate the demographic characteristics, clinical profile and outcomes of HIV-infected children who received treatment at the counseling center for behavioral diseases in Imam Khomeini Hospital between 2004 to 2020. The prevalence of opportunistic infections was found to be (28.3%). While all HIV-infected individuals are susceptible to a wide variety of opportunistic infections [30], the prevalence and incidence of HIV-associated opportunistic infections can vary considerably [17, 19]. Most publications on the frequency of opportunistic infections among HIV-infected children come from North America and Europe, leaving the burden of opportunistic infections among HIV-infected children in low- and middle-income countries inadequately reported [22]. In these regions, TB, oral candidiasis, varicella zoster, pneumocystis pneumonia, bacterial pneumonia, herpes zoster, and dermatophyte infections are the most prevalent opportunistic infections [3, 15]. The present study identified oral candidiasis (20%) as the most common

Table 1. Demographic characteristics and clinical profile of children living with HIV, 2004–2020

Characteristics	Subcharacteristics	N (%)
Age, year, mean±SD		10.03 (4.60)
Age at diagnosis, year, mean±SD		3.81 (3.53)
Sex	Male	37 (61.6%)
	Female	23 (38.3%)
Child's care	Family care	51 (85%)
	Welfare care	6 (10%)
	Guardianship	3 (5%)
HIV-positive mother		56 (93.3%)
History of hospitalization		21 (35.0%)
Positive PPD		2 (7.7%)
Positive Toxo IgG		7 (17.5%)
Positive HBs Ab		17 (41.5%)
Positive HBs Ag		0 (0%)
Positive HCV Ab		0 (0%)
Positive CMV IgG		34 (81%)
Positive CMV IgM		4 (11.1%)
Mothers HIV-treatment	Not available	7 (11.7%)
	No treatment	7 (11.7%)
	Under treatment	36 (60%)
	Passed away	6 (10%)
Treatment adherence	Acceptable	56 (93.3%)
	Not enough adherence	4 (6.7%)
CD4 count before treatment, mean±SD		855.51 (1153.46)
Latest CD4, mean±SD		1074.39 (619.38)
Length of ART, month, mean±SD		69.96 (40.29)
FBS, mean±SD		88.45 (12.46112)
Cr, mean±SD		0.5612 (0.11954)
Hg, mean±SD		11.25 (1.57895)
TG, mean±SD		118.575 (64.4304)
Cholesterol, mean±SD		132.9487 (34.51007)
LDL, mean±SD		74.75 (33.94588)
HDL, mean±SD		36.9375 (15.62863)

opportunistic infection, followed by herpes (5%), and varicella zoster (3.33%).

Opportunistic infections are the primary causes of morbidity and mortality in HIV-positive children, accounting for 94.1% of HIV-related deaths [20]. In this study, the hospitalization rate for HIV-infected children was 35%, with the most common reason being delayed diagnosis of infected children and failure to identify infected mothers in a timely manner, leading to candidiasis, weakness, lethargy, and fever during their initial visit to the medical center (11.6%). Another significant cause of hospitalization was pneumonia, accounting for 11.6% of all hospitalizations in the study population. Similar results were observed in a study conducted in Thailand, where 35% of children were hospitalized [10]. Moreover, two cases of pediatric HIV resulted in mortality (3.33%). The first patient wasn't receiving therapy, however, there is no available record of the cause of the patient's death. The second patient was a known case of TB, who died due to pneumonia while hospitalized.

Despite the advances in ART for HIV patients, we are yet to reach the point of no mortality in this disease. A recent systematic review of pediatric HIV mortality showed 7.9% all-cause cumulative death among patients [2]. In our study, 3.33% of patients passed away, including one due to lack of treatment and the other due to pneumonia.

HIV-infected children usually get infected vertically through mother-to-child transmission during pregnancy, delivery, or breastfeeding. Brahmhatt et al. [8] showed that more than 20% of children born from infected mothers are infected with HIV at birth and during breastfeeding. In our study, more than 90% of pediatric HIV cases were born from infected mothers.

Although pediatric HIV treatment has made a lot of advances since the beginning of the pandemic, the general lack of well-tolerated age-appropriate formulations remained a major challenge. There are limited approved ART options for pediatric HIV infection, and their possible effects on neurocognitive development are still under investigation [23]. In our study, the initial and final treatment regimens prescribed for the patients were collected. Our results demonstrated that 76.7% of patients received at least zidovudine and lamivudine as their initial therapy and 48.4% as their final treatment. Recent pediatric guidelines suggest using two nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) plus dolutegravir (DTG). Further studies could be done to assess the reasons behind zidovudine and lamivudine being the first choice of physicians on the NRTIs list and the less frequent use of DTG in the treatment regimen for children. Our results show an increase in mean CD4 count from 855.5 ± 113.46274 to 1074.393. As more than 90% of patients had acceptable adherence to treatment, we can suggest that ART treatment had an impact on CD4 cell count.

Table 2. Current ART regimens among children living with HIV, 2004–2020

ART Regimens	N (%)
LPV/r, ZDV, 3TC	7 (11.7)
ZDV, 3TC, NVP	13 (21.7)
ZDV, 3TC, EFV	16 (26.7)
ZDV, 3TC, DTG	3 (5)
ZDV, 3TC, ATV/r	1 (1.7)
LPV/r, TDF, FTC	2 (3.3)
TDF, FTC, EFV	2 (3.3)
EFV, 3TC, ABC	2 (3.3)
3TC, LPV/r, TDF	1(1.7)
DTG, TDF, FTC, LPV/r	1 (1.7)
3TC, LPV/r, ABC	3 (5)
3TC, TDF, DRV/r	1 (1.7)
3TC, ABC, DRV/r	1 (1.7)
TDF, FTC, DTG	4 (6.7)
3TC, ABC, DTG	2 (3.3)
TDF, FTC, ATV/r	1 (1.7)

Note. LPV/r: Lopinavir/Ritonavir, ZDV: Zidovudine, 3TC: lamivudine, NVP: Nevirapine, EFV: Efavirenz, DTG: Dolutegravir, ATV/r: Atazanavir/ritonavir, ABC: Abacavir, TDF: Tenofovir disoproxil fumarate, FTC: Emtricitabine, DRV/r: Darunavir/ritonavir.

Table 3. Initial ART regimes in children living with HIV, 2004–2020

ART Regimens	N (%)
ZDV, 3TC, NVP	24 (40.0)
ZDV, 3TC, EFV	22 (36.7)
ZDV, 3TC, LPV/r	4 (6.7)
3TC, NVP, ABC	1 (1.7)
TDF, FTC, EFV	3 (5.0)
3TC, LPV/r, TDF	1 (1.7)
3TC, EFV, ABC	3 (5.0)
3TC, ABC, LPV/r	2 (3.3)

Table 4. ART-related side effects in children living with HIV, 2004–2020

Drug side effects	Type	N (%)
No identified side effect		39 (65)
Side effects	Vomiting	7 (33.3)
	Diarrhea	3 (14)
	Decrease in hemoglobin levels	2 (9.5)
	Skin lesions	2 (9.5)
	Steven Johnson syndrome	1 (4.7)
	Insomnia and restlessness	2 (9.5)
	Aggressiveness	2 (9.5)
	Dizziness	1 (4.7)
	Urinary frequency	1 (4.7)
	Loss of appetite	1 (4.7)
	Sore throat	1 (4.7)

Table 5. Reasons for change of medication regimen in children living with HIV, 2004–2020

Reason	N (%)
No change	37 (61.7%)
Drug resistance	6 (10.0%)
Drug adverse reaction	9 (15%)
Both	5 (8.3%)
Other reasons	2 (3.3%)
Unknown	1 (1.7%)

Failure of treatment is an important topic to address both in adolescents and children infected with HIV, as the risk of mortality significantly increases in this condition. A recent meta-analysis by Endalamaw and his colleagues [13] revealed that about 14.6% of children experience this phenomenon. Moreover, another study from a pilot cohort in South Africa [7] shows that delayed start of ART treatment is a risk factor for treatment failure, and many of these patients experience higher viremia periods, failing to reach viral load suppression levels during their treatment.

The long-time therapy and treatment adherence challenges in HIV disease as a chronic condition are serious issues that should be addressed. This problem can eventually lead to drug resistance and severe life-threatening side effects [14]. Shubber and her colleagues [26] specifically investigated how patients describe their barriers to adherence to ART and reported forgetting and being away from home as the most common reasons. A systematic review on HIV treatment adherence in middle and low-income countries reported more than 75% adherence in most of included studies [29]. In our study, the adherence rate to treatment was 93.3%, which is higher than in previous reports.

In this study, the researchers investigated drug-related side effects. Among the participants, 65% did not experience any identified drug-related side effects. However, vomiting and diarrhea were found to be the most prevalent among those who did. Additionally, the study identified two life-threatening side effects: Stevens–Johnson syndrome and a decrease in hemoglobin.

Although ART is crucial and lifesaving for pediatric patients with HIV, it can also result in various complications such as metabolic syndrome, dyslipidemia, and renal disease. Vargas–Pacherrez’s study highlighted that approximately half of the HIV-infected patients in Bahia experienced metabolic syndrome [28]. In our study, although there were cases with higher-than-normal levels of lipid profile and blood sugar, the overall mean of cases in each of these markers did not exceed the maximum value within their respective ranges.

Determining the coexistence of TB and HIV is crucial in pediatric HIV as studies have shown that about 17% of pediatric TB mortality occurs in HIV-positive children. The complexity of the situation is further

compounded by the matter of drug interaction in these patients and that these children may derive less benefit from Bacillus Calmette–Guerin (BCG) vaccine [16]. In our study, only two cases of co-accordance of HIV and TB were identified. However, this prevalence might be underestimated as we encountered some missing data in this aspect. Lack of available data regarding the coexistence of HIV with other viral diseases including hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), and CMV was less common. None of the patients were exposed to HCV. Although more than 40% of patients had prior exposure to HBV, none of them were infected with it at the time of data collection. More than 80% of patients were previously infected with CMV but only 10% were actively infected. These results are consistent with the results obtained in a study of Varo et al. who found CMV IgG was the most common positive result in all age groups (in 73% of children < 1 year, and 100% in all other groups). Three patients were CMV IgM positive (3.3%), suggesting acute infection. In a similar study from Malawi, HSV-2 IgG was positive in four patients (4.4%), and HBs Ag in two (2.2%) among 91 HIV-Infected Malawian Children [9].

The results of the present study should be interpreted considering several limitations, such as a small sample size, incomplete patient records, and the lack of follow-up records in some cases. To address these limitations, large-scale investigations with designs ensuring the obtaining of complete patient records and follow-up data are needed.

Conclusion

Our study contributes significant insights into the demographic and para-clinical characteristics of HIV-infected children in Iran, shedding light on their long-term outcomes and potential complications. The findings from our research provide valuable information that can inform policymakers and healthcare professionals in their efforts to address the ongoing HIV epidemic within the country. This may involve implementing comprehensive prevention programs, expanding access to HIV testing and treatment services, and providing specialized care for HIV-infected children. Furthermore, our study highlights the critical need for further research in the field of pediatric HIV in Iran. Despite the progress made in recent years, there remains a severe lack of knowledge regarding the specific needs and experiences of this vulnerable population. Future studies should aim to fill these knowledge gaps, focusing on areas such as optimal treatment approaches, long-term monitoring, and the impact of socioeconomic factors on HIV outcomes in children.

Conflict of Interest

The authors confirm that they have no conflict of interest.

References

1. Abubakari A., Issah H., Mutaka M.A.O., Asumah M.N. Determinants of virological failure in HIV patients on highly active antiretroviral therapy (HAART): a retrospective cross-sectional study in the upper east region of Ghana. *Venereology*, 2023, vol. 2, no. 1, pp. 16–29. doi: 10.3390/venereology2010002
2. Ahmed I., Lemma S. Mortality among pediatric patients on HIV treatment in sub-Saharan African countries: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, 2019, vol. 19, no. 1: 149. doi: 10.1186/s12889-019-6482-1
3. Alarcón J.O., Freimanis-Hance L., Krauss M., Reyes M.F., Cardoso C.A., Mussi-Pinhata M.M., Cardoso E., Hazra R.; NISDI Pediatric Study Group 2011. Opportunistic and other infections in HIV-infected children in Latin America compared to a similar cohort in the United States. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2012, vol. 28, no. 3, pp. 282–288. doi: 10.1089/aid.2011.0057
4. Alinaghi S.A.S., Rasoolinejad M., Najafi Z., Dadras O., Malekianzadeh E., Mirzazadeh A. Drug resistance patterns in HIV patients with virologic failure in Iran. *Arch. Clin. Infect. Dis.*, 2019, vol. 14, no. 6: e96531. doi: 10.5812/archcid.96531
5. Atuhaire L., Shumba C.S., Mapahla L., Nyasulu P.S. A retrospective cross sectional study assessing factors associated with retention and non-viral suppression among HIV positive FSWs receiving antiretroviral therapy from primary health care facilities in Kampala, Uganda. *BMC Infect. Dis.*, 2022, vol. 22, no. 1: 642. doi: 10.1186/s12879-022-07614-w
6. Barlow-Mosha L., Musiime V., Davies M.A., Prendergast A.J., Musoke P., Siberry G., Penazzato M. Universal antiretroviral therapy for HIV-infected children: a review of the benefits and risks to consider during implementation. *J. Int. AIDS Soc.*, 2017, vol. 20, no. 1: 21552. doi: 10.7448/IAS.20.1.21552
7. Bernheimer J.M., Patten G., Makeleni T., Mantangana N., Dumile N., Goemaere E., Cox V. Paediatric HIV treatment failure: a silent epidemic. *J. Int. AIDS Soc.*, 2015, vol. 18, no. 1: 20090. doi: 10.7448/IAS.18.1.20090
8. Brahmabhatt H., Kigozi G., Wabwire-Mangen F., Serwadda D., Lutalo T., Nalugoda F., Sewankambo N., Kiduggavu M., Wawer M., Gray R. Mortality in HIV-infected and uninfected children of HIV-infected and uninfected mothers in rural Uganda. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, 2006, vol. 41, no. 4, pp. 504–508. doi: 10.1097/01.qai.0000188122.15493.0a
9. Chasela C.S., Kourtis A.P., Wall P., Drobeniuc J., King C.C., Thai H., Teshale E.H., Hosseinipour M., Ellington S., Codd M.B., Jamieson D.J., Knight R., Fitzpatrick P., Kamili S., Hoffman I., Kayira D., Mumba N., Kamwendo D.D., Martinson F., Powderly W., Teo C.G., van der Horst C.; BAN Study Team. Hepatitis B virus infection among HIV-infected pregnant women in Malawi and transmission to infants. *J. Hepatol.*, 2014, vol. 60, no. 3, pp. 508–514. doi: 10.1016/j.jhep.2013.10.029
10. Ciaranello A.L., Chang Y., Margulis A.V., Bernstein A., Bassett I.V., Losina E., Walensky R.P. Effectiveness of pediatric antiretroviral therapy in resource-limited settings: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.*, 2009, vol. 49, no. 12, pp. 1915–1927. doi: 10.1086/648079
11. Eckard A.R., Fowler S.L., Haston J.C., Dixon T.C. Complications of treatment in youth with HIV. *Curr. HIV/AIDS Rep.*, 2016, vol. 13, no. 4, pp. 226–233. doi: 10.1007/s11904-016-0320-1
12. Emamzadeh-Fard S., Fard S.E., SeyedAlinaghi S., Paydary K. Adherence to anti-retroviral therapy and its determinants in HIV/AIDS patients: a review. *Infect. Disord. Drug. Targets.*, 2012, vol. 12, no. 5, pp. 346–356. doi: 10.2174/187152612804142251
13. Endalamaw A., Mekonnen M., Geremew D., Yehualashet F.A., Tesera H., Habtewold T.D. HIV/AIDS treatment failure and associated factors in Ethiopia: meta-analysis. *BMC Public Health*, 2020, vol. 20, no. 1: 82. doi: 10.1186/s12889-020-8160-8
14. Haberer J., Mellins C. Pediatric adherence to HIV antiretroviral therapy. *Curr. HIV/AIDS Rep.*, 2009, vol. 6, no. 4, pp. 194–200. doi: 10.1007/s11904-009-0026-8
15. Haileamlak A., Hagos T., Abebe W., Abraham L., Asefa H., Teklu A.M. Predictors of hospitalization among children on ART in Ethiopia: a cohort study. *Ethiop. J. Health Sci.*, 2017, vol. 27, suppl. 1, pp. 53–62. doi: 10.4314/ejhs.v27i1.6s
16. Kay A., Garcia-Prats A.J., Mandalakas A.M. HIV-associated pediatric tuberculosis: prevention, diagnosis and treatment. *Curr. Opin. HIV/AIDS*, 2018, vol. 13, no. 6, pp. 501–506. doi: 10.1097/COH.0000000000000500
17. Kharsany A.B., Karim Q.A. HIV Infection and AIDS in Sub-Saharan Africa: current status, challenges and opportunities. *Open AIDS J.*, 2016, vol. 10, pp. 34–48. doi: 10.2174/1874613601610010034
18. Khazaei S., Rezaeian S. Increasing rate of mortality due to HIV/AIDS in Iranian children: an alarm for health policymakers. *Iran. J. Public Health*, 2017, vol. 46, no. 7, pp. 1001–1002.
19. Low A., Gavrilidis G., Larke N., B-Lajoie M.R., Drouin O., Stover J., Muhe L., Easterbrook P. Incidence of opportunistic infections and the impact of antiretroviral therapy among HIV-Infected adults in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.*, 2016, vol. 62, no. 12, pp. 1595–1603. doi: 10.1093/cid/ciw125
20. Melkamu M.W., Gebeyehu M.T., Afenigus A.D., Hibstie Y.T., Temesgen B., Petrucka P., Alebel A. Incidence of common opportunistic infections among HIV-infected children on ART at Debre Markos referral hospital, Northwest Ethiopia: a retrospective cohort study. *BMC Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 1: 50. doi: 10.1186/s12879-020-4772-y
21. NIH. HIV and Children and Adolescents. URL: <https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/fact-sheets/hiv-and-children-and-adolescents>
22. Prasitsuebsai W., Kariminia A., Puthanakit T., Lumbiganon P., Hansudewechakul R., Siew Moy F., Law M., Kumarasamy N., Razali K., Sirisanthana V., Sohn A.H., Chokephaibulkit K. Impact of antiretroviral therapy on opportunistic infections of HIV-infected children in the therapeutic research, education and AIDS training asia pediatric HIV observational database. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2014, vol. 33, no. 7, pp. 747–752. doi: 10.1097/INF.0000000000000226
23. Rakhmanina N., Phelps B.R. Pharmacotherapy of pediatric HIV infection. *Pediatr. Clin. North. Am.*, 2012, vol. 59, no. 5, pp. 1093–1115. doi: 10.1016/j.pcl.2012.07.009
24. Sadiq U., Shrestha U., Guzman N. Prevention of opportunistic infections in HIV/AIDS. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513345/>
25. SeyedAlinaghi S., Taj L., Mazaheri-Tehrani E., Ahsani-Nasab S., Abedinzadeh N., McFarland W., Mohraz M., Mirzazadeh A. HIV in Iran: onset, responses, and future directions. *AIDS*, 2021, vol. 35, no. 4, pp. 529–542. doi: 10.1097/QAD.0000000000002757
26. Shubber Z., Mills E.J., Nachege J.B., Vreeman R., Freitas M., Bock P., Nsanzimana S., Penazzato M., Appollo T., Doherty M., Ford N. Patient-reported barriers to adherence to antiretroviral therapy: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.*, 2016, vol. 13, no. 11: e1002183. doi: 10.1371/journal.pmed.1002183

27. UNAIDS. Country progress report — Iran. 2020. URL: https://www.unaids.org/sites/default/files/country/documents/IRN_2020_countryreport.pdf
28. Vargas-Pacherrez D., Cotrim H.P., Pires L., Cunha V., Coelho V., Brites C., Daltro C. Metabolic syndrome in HIV-patients in antiretroviral therapy. *Curr. HIV Res.*, 2020, vol. 18, no. 6, pp. 388–395. doi: 10.2174/1570162X18666200609115615
29. Vreeman R.C., Wiehe S.E., Pearce E.C., Nyandiko W.M. A systematic review of pediatric adherence to antiretroviral therapy in low- and middle-income countries. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2008, vol. 27, no. 8, pp. 686–691. doi: 10.1097/INF.0b013e31816dd325
30. WHO. Global health sector strategy on HIV. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>

Авторы:

Хасаннежад М., д.м.н., доцент, Иранский исследовательский центр ВИЧ/СПИДа, Иранский институт снижения поведения высокого риска, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;

Абдолсалехи М.Р., д.м.н., доцент кафедры инфекционных заболеваний Педиатрического центра передового опыта Детского медицинского центра Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;

Маншади С.А.Д., д.м.н., Иранский исследовательский центр ВИЧ/СПИДа, Иранский институт снижения поведения высокого риска, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;

Асади С.М., д.м.н., научный сотрудник, Иранский исследовательский центр ВИЧ/СПИДа, Иранский институт снижения поведения высокого риска, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;

Шахмохамеди Э., д.м.н., научный сотрудник, Иранский исследовательский центр ВИЧ/СПИДа, Иранский институт снижения поведения высокого риска, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;

Аббаспур Ф., д.м.н., научный сотрудник, Иранский исследовательский центр ВИЧ/СПИДа, Иранский институт снижения поведения высокого риска, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;

Джахани Ш., д.м.н., научный сотрудник, Иранский исследовательский центр ВИЧ/СПИДа, Иранский институт снижения поведения высокого риска, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;

СейедАлиаги С., д.м.н., магистр философии, доктор философии, доцент, Иранский исследовательский центр ВИЧ/СПИДа, Иранский институт снижения поведения высокого риска, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран.

Authors:

Hassannezhad M., MD, Assistant Professor, Iranian Research Center for HIV/AIDS, Iranian Institute for Reduction of High-Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Abdolsalehi M.R., MD, Associate Professor, Department of Infectious Disease, Pediatric Center of Excellence, Children's Medical Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Manshadi S.A.D., MD, Associate Professor, Iranian Research Center for HIV/AIDS, Iranian Institute for Reduction of High-Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Asadi S.M., MD, Researcher, Iranian Research Center for HIV/AIDS, Iranian Institute for Reduction of High-Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Shahmohamadi E., MD, Researcher, Iranian Research Center for HIV/AIDS, Iranian Institute for Reduction of High-Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Abbaspour F., MD, Researcher, Iranian Research Center for HIV/AIDS, Iranian Institute for Reduction of High-Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Jahani S., MD, Researcher, Iranian Research Center for HIV/AIDS, Iranian Institute for Reduction of High-Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

SeyedAlinaghi S., MD, MPhil, PhD, Associate Professor, Iranian Research Center for HIV/AIDS, Iranian Institute for Reduction of High-Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Поступила в редакцию 15.08.2023
Отправлена на доработку 06.10.2024
Принята к печати 27.11.2023

Received 15.08.2023
Revision received 06.10.2024
Accepted 27.11.2023

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ В УСЛОВИЯХ КАРДИОХИРУРГИЧЕСКОГО СТАЦИОНАРА

М.В. Кузнецова^{1,2}, В.И. Сергевнин², В.С. Михайловская¹, Л.Г. Кудрявцева³, О.Г. Пегушина³

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН — филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Пермь, Россия

² ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь, Россия

³ ФГБУ Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии имени С.Г. Суханова Минздрава России, г. Пермь, Россия

Резюме. *Klebsiella pneumoniae* является одним из основных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), во всем мире. Цель исследования: молекулярно-генетическая характеристика устойчивости к бета-лактамам антибиотикам культур *K. pneumoniae*, выделенных в условиях кардиохирургического стационара, выявление гипервирулентных изолятов, а также оценка генетического родства культур. Были изучены изоляты, выделенные из клинического материала пациентов (n = 50) кардиохирургических отделений и отделения анестезиологии и реанимации (ОАиР), находившихся на лечении в кардиохирургическом стационаре г. Перми с июля 2021 г. по декабрь 2022 г. Бактериологические исследования были выполнены на автоматическом анализаторе «WalkAway-96Plus» (Beckman Coulter, США). Определена чувствительность культур к тринадцати антимикробным препаратам и продукция бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС), оценен фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Для определения гипермукоидного фенотипа *K. pneumoniae* использовали стринг-тест. Родственность изолятов (ERIC-ПЦР), присутствие генов бета-лактамаз (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{NDM-1}), а также генов, ассоциированных с гипервирулентностью (*prmpA*, *iucA*, *peg-344*, *wzyK2*, *magA*), определяли методом ПЦР по конечной точке. Амплификацию проводили на термоциклере «DNA Engine Dyad Thermal Cycler» (Bio-Rad, США), визуализацию полос и документирование данных осуществляли с помощью системы гель-документации «Gel-Doc XR» (Bio-Rad, США). По результатам исследования установлено, что карбапенемоустойчивые *K. pneumoniae* составили почти 76% всех культур, фенотип БЛРС имели 90%, а МЛУ — 88% изолятов. Среди определенных бета-лактамаз наиболее широко в коллекции культур были представлены ферменты типов CTX-M, VIM-2 и NDM-1, гены которых часто локализованы на мобильных генетических элементах, обеспечивающих быстрое внутри- и межвидовое распространение. Согласно результатам стринг-теста, гипермукоидный фенотип имели 8% изолятов *K. pneumoniae*. В отношении генов, ассоциированных с гипервирулентностью, показано, что наиболее рас-

Адрес для переписки:

Кузнецова Марина Валентиновна
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13,
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.
Тел.: 8 (342) 212-44-76. E-mail: mar@iegm.ru

Contacts:

Marina V. Kuznetsova
614081, Russian Federation, Perm, Goleva str., 13,
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch
Russian Academy of Sciences.
Phone: +7 (342) 212-44-76. E-mail: mar@iegm.ru

Для цитирования:

Кузнецова М.В., Сергевнин В.И., Михайловская В.С., Кудрявцева Л.Г., Пегушина О.Г. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в условиях кардиохирургического стационара // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 103–114. doi: 10.15789/2220-7619-MAM-15631

Citation:

Kuznetsova M.V., Sergevnin V.I., Mihailovskaya V.S., Kudryavtseva L.G., Pegyushina O.G. Microbiological and molecular genetic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates, extracted under conditions of cardiac surgery hospital // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 103–114. doi: 10.15789/2220-7619-MAM-15631

Работа выполнена в рамках НИОКР № 124020500028-4.

This work was supported by Research & Development program (No. 124020500028-4).

пространственным оказался ген *iucA*, амплифицированный у 54% изолятов, *prmpA* детектировали у 38% культур, 48% культур имели гены *wzyK2* или *magA*, маркирующие капсулы типа K1/K2. Почти треть *K. pneumoniae* сохранила комбинацию генов *prmpA* и *iucA*, при этом выделяли их чаще в группе пациентов с активной инфекцией. Гипермукоидный фенотип, капсульный тип K1 и комбинацию генов *prmpA*, *iucA*, *peg-344* имели только чувствительные к карбапенемам культуры, тогда как капсульный тип K2 был наиболее распространен среди устойчивых к карбапенемам *K. pneumoniae*. На основании молекулярно-генетического типирования выявлено, что 24% культур *K. pneumoniae* распределились в 4 геномогруппы идентичных изолятов, 76% культур имели индивидуальные профили. Обнаружены близкородственные изоляты у пациентов разных отделений, что указывает на возможную циркуляцию возбудителя в замкнутом контуре «отделение—ОАиР—отделение».

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, кардиохирургический стационар, молекулярное типирование, бета-лактамазы расширенного спектра, карбапенемазы, гипервирулентность.

MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLATES, EXTRACTED UNDER CONDITIONS OF CARDIAC SURGERY HOSPITAL

Kuznetsova M.V.^{a,b}, Sergevnin V.I.^b, Mihailovskaya V.S.^a, Kudryavtseva L.G.^c, Pegyshina O.G.^c

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

^b Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation

^c Cardiovascular Surgery Federal Center named after S.G. Sukhanov Ministry of Health of the Russian Federation, Perm, Russian Federation

Abstract. *Klebsiella pneumoniae* is one of the main causative agents of healthcare-associated infections (HAI) worldwide. The study was aimed at molecular characterization of beta-lactam antibiotic resistance in *K. pneumoniae* isolated in the cardiac surgery hospital, identify hypervirulent isolates and assess isolate genetic relatedness. *K. pneumoniae* isolated from the clinical material of patients (n = 50) at cardiac surgery departments as well as anesthesiology and reanimation department treated at the cardiovascular surgery hospital in Perm from July 2021 to December 2022 were analyzed. Bacteriological studies were performed on an automatic analyzer WalkAway-96Plus (Beckman Coulter, USA). The sensitivity to thirteen antimicrobials, production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and multidrug resistance (MDR) phenotype were assessed. The string test was used to screen hypermucoviscous *K. pneumoniae*. Isolate relatedness (ERIC-PCR), presence of beta-lactamase genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{NDM-1}), as well as genes associated with hypervirulence (*prmpA*, *iucA*, *peg-344*, *wzyK2*, *magA*) were analyzed by PCR. Amplifications were performed in a DNA Engine Dyad Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Gel documentation system Gel-Doc XR (Bio-Rad, USA) was used for band visualization and data documentation. According to the study results, it was found that carbapenem-resistant isolates accounted for almost 76% of all isolates, the ESBL-phenotype had 90%, and MDR-phenotype — 88% of studied isolates. According to the string test results, 8% of *K. pneumoniae* isolates had a hypermucoviscous phenotype. As for genes associated with hypervirulence, it was shown that the *iucA* gene was the most common, amplified in 54% of isolates, *prmpA* was detected in 38% of isolates, 48% of isolates had *wzyK2* or *magA* genes encoding capsular type K1/K2. Almost a third of *K. pneumoniae* samples contained a combination of the *prmpA* and *iucA* genes, and they were isolated more often in the group of patients with active infection. Only carbapenem-sensitive microorganisms had hypermucoviscous phenotype, K1 capsular type, and a combination of *prmpA*, *iucA*, *peg-344* genes, whereas the K2 capsular type was most common among carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. Based on molecular genetic typing, it was found that 24% of *K. pneumoniae* isolates were assigned to four genome groups of identical cultures, 76% of the isolates had individual profiles. Closely related isolates were found among patients from different departments that indicates a potential pathogen circulation in the closed circuit “surgery department—department of anesthesiology” and “reanimation—surgery department”.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, cardiac surgery hospital, molecular typing, extended beta-lactamase spectrum, carbapenemase, hypervirulence.

Введение

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) является одним из основных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), во всем мире [8, 11, 32, 37]. В условиях стационара клебсиеллезная инфекция может быть следствием эндогенного инфицирования, а также результатом попадания возбудителя из объектов больницы среды [8]. Известно, что предварительная колонизация желудочно-кишечного тракта бактериями *K. pneumoniae* способствует развитию

эндогенной инфекции у пациентов в послеоперационный период [27]. Пациенты, перенесшие операции на сердце, подвергаются повышенному риску развития ИСМП по сравнению с другими группами хирургических больных в связи с выраженной иммуносупрессией [12, 18].

Из-за высокой способности *K. pneumoniae* приобретать резистентность к антимикробным препаратам лечение инфекционных осложнений представляет проблему для всех категорий больных [29, 33]. По мнению ряда авторов, продукция бета-лактамаз расширенного спектра

(БЛРС) является основной причиной высокой смертности среди пациентов с инфекциями, вызванными *K. pneumoniae* [10, 32]. В качестве резервного варианта лечения пациентов с тяжелыми инфекциями в стационарах используют карбапенемы, что привело к появлению продуцентов карбапенемо-гидролизующих лактамаз (карбапенемаз) как основного механизма резистентности к этой группе антибиотиков. Сегодня отмечается высокая распространенность нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae*, обладающих устойчивостью к карбапенемам и/или множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) как в России, так и за рубежом [3, 10, 12, 27, 33].

Многочисленными исследованиями показано, что МЛУ является характерным свойством штаммов клебсиелл, принадлежащих к эволюционной ветви классических *K. pneumoniae*, а способность вызывать тяжелые формы инфекций — штаммов, относящихся к эволюционной ветви гипервирулентных *K. pneumoniae* [1]. Вирулентные свойства бактерий *K. pneumoniae* связаны с наличием полисахаридной капсулы, фимбрий, систем эффлюкса и секреции VI типа, а также с продукцией сидерофоров и способностью утилизировать аллантоин [27]. Гипервирулентный патотип возбудителя ассоциирован с несколькими геномными кластерами и индивидуальными генами (*iucABCD* и *iroBCDN*, *peg-344* и *peg-589*, *rmpA* и *rmpA2*), расположенными на плаزمиде, наличие которых, как было показано, коррелирует с вирулентностью в моделях инфекции *in vivo* [37]. Установлена принадлежность гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae* к K1- и K2-капсульным серологическим типам (K-типам), представители которых наиболее распространены в клинической практике и часто обладают гипермукоидным фенотипом [31]. Появление и распространение гипервирулентных и антибиотикорезистентных штаммов усугубило проблему, связанную с нозокомиальным инфицированием *K. pneumoniae* [2, 19, 22, 23, 24, 36].

Комплексных исследований молекулярно-генетических свойств *K. pneumoniae* с использованием данных микробиологического мониторинга в кардиохирургических стационарах недостаточно. Ранее нами была изучена групповая заболеваемость гнойно-септическими инфекциями клебсиеллезной этиологии пациентов крупного кардиохирургического стационара [7]. Показано, что штаммы *K. pneumoniae* были полирезистентными, и, в большинстве случаев, устойчивыми к карбапенемам. В этой работе представлены данные о молекулярно-генетических свойствах штаммов *K. pneumoniae*, циркулирующих в кардиохирургическом стационаре г. Перми.

Цель исследования — провести молекулярно-генетическую характеристику устойчивости к бета-лактамам антибиотикам культур *K. pneumoniae*, выделенных в условиях кардиохирургического стационара, выявить гипервирулентные изоляты, а также оценить генетическое родство культур.

Материалы и методы

Объектами изучения служили 50 изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из клинического материала (моча, кровь, мокрота, отделяемое раны и др.) пациентов, находившихся на лечении в кардиохирургическом стационаре г. Перми в период с июля 2021 г. по декабрь 2022 г. Для анализа полученных данных все изоляты были разделены на 2 группы: первая группа — изоляты от пациентов, длительно (более 48 ч) находящихся в ОАиР ($n = 31$), вторая группа — изоляты от пациентов, не прошедших ОАиР или находящихся в ОАиР менее 48 ч ($n = 19$). Последние были обозначены как изоляты от пациентов кардиохирургических отделений (КХО): 18% ($n = 9$) из КХО № 1, 14% ($n = 8$) из КХО № 2, по 2% ($n = 1$) из КХО № 3 и КХО № 4. Из числа обследованных пациентов 28 человек имели клинические проявления гнойно-септических инфекций (острая инфекция), 22 изолята были отнесены к бессимптомному носительству (колонизации).

Бактериологические исследования были выполнены на автоматическом анализаторе «WalkAway-96Plus» (Beckman Coulter, США) с использованием панели NBC 41. Чувствительность к антибиотикам изучали путем определения минимальных ингибирующих концентраций к тринадцати антимикробным препаратам. Культуры клебсиелл тестировали на чувствительность к бета-лактамам (ампициллин цефотаксим, цефтазидим, цефтриаксон, цефепим), включая ингибитор-защищенные бета-лактамы (ампициллин/сульбактам, амоксициллин/клавуланат) и карбапенемы (меропенем, имипенем), аминогликазидам (гентамицин, амикацин) и фторхинолонам (ципрофлоксацин, левофлоксацин). Результаты интерпретировали в соответствии с клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (EUCAST-2023, версия 13.0).

Продукцию БЛРС детектировали на бактериологическом анализаторе «WalkAway-96Plus» (Beckman Coulter, США) с использованием панели NBC 41. Фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) оценивали, как описано [26].

Для определения гипермукоидного фенотипа клебсиелл использовали стринг-тест [14]. Колонии выращивали на кровяном агаре при

температуре 37°C в течение 18–20 ч. Тест считали положительным, если слизь с колоний вытягивалась бактериологической петлей на 5 мм с поверхности агара.

Для выделения ДНК петлю биомассы бактериальной культуры инокулировали в 100 мкл сверхчистой воды, прогревали при 97°C в твердотельном термостате с таймером ТТ-2 «Термит» (Россия) 15 мин, пробы охлаждали, центрифугировали 5 мин при 13 тыс. об/мин. Супернатанты перенесли в чистые эппендорфы и хранили при –20°C.

Присутствие генов бета-лактамаз *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{NDM-1}, а также генов, ассоциированных с гипервирулентностью — *prmpA*, *iucA*, *peg-344*, *wzyK2*

и *magA*, определяли методом ПЦР по конечной точке, используя праймеры (ООО «Синтол», Москва, Россия) и протоколы, согласно рекомендациям авторов (табл. 1). Амплификацию проводили на термоциклере «DNA Engine Dyad Thermal Cycler» (Bio-Rad, США). Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с помощью системы гель-документации «Gel-Doc XR» (Bio-Rad, США).

Генетическое типирование культур осуществляли в системе двойного контроля посредством гер-ПЦР с праймером M13 (5'-GAG GGTGGCGGTTCT) и с праймерами ERIC1/ERIC2 (5'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA/5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG), исполь-

Таблица 1. Праймеры для детекции генов бета-лактамаз, интегროнов 1 класса (А) и генов вирулентности (Б)

Table 1. Primers for detection of beta-lactamase genes, class 1 integrons (A) and virulence genes (B)

А (А)

Ген Gene	Праймер Primer	Последовательность 5'-3' Sequence 5'-3'	п.н. bp	Источник Reference
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-C	ATCAGCAATAAACCCAGC	516	Aleisa, 2013
	TEM-H	CCCCGAAGAACGTTTTTC		
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	AGGATTGACTGCCTTTTTG	392	
	SHV-R	ATTTGCTGATTCGCTCG		
<i>bla</i> _{OXA}	OXA-F	ATATCTCTACTGTTGCATCTCC	619	
	OXA-R	AAACCCTTCAAACCATCC		
<i>bla</i> _{CTX-M} унив./universal	CTX-M-F	CGTCTTGCGATGTGCAG	551	Ahmed, 2007
	CTX-M-R	ACCGCGATATCGTTGGT		
<i>bla</i> _{VIM-2}	VIM-2F	ATGTTCAAACCTTTTGAGTAGTAAG	801	Poirel et al., 2000 Senda et al., 1996
	VIM-2R	CTACTCAACGACTGAGCG		
<i>bla</i> _{IMP}	IMP1-F	ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC	587	
	IMP1-R	ACAACCAGTTTTGCCTTACC		
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	TGTTGCTGAAGGAGTTGGGC	340	
	KPC-R	ACGACGGCATAGTCATTTGC		
<i>bla</i> _{NDM-1}	NDM-F	TAAAATACCTTGAGCGGGC	439	
	NDM-R	AAATGGAACTGGCGACC		
Интегроны 1 класса Class 1 integrons	5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	—*	Lévesque, 1995
	3'CS	AAGCAGACTTGACCTGA		

Б (Б)

Ген Gene	Праймер Primer	Последовательность 5'-3' Sequence 5'-3'	п.н. bp	Источник Reference
<i>prmpA</i>	prmpA-F	GAGTAGTTAATAAATCAATAGCAAT	332	Russo et al., 2018
	prmpA-R	CAGTAGGCATTGCAGCA		
<i>iucA</i>	iucA-1F	AATCAATGGCTATTTCCCGCTG	239	
	iucA-1R	CGCTTCACTTCTTTCACTGACAGG		
<i>peg-344</i>	peg344-2F	AAAGGACAGAAAGCCAGTG	411	
	peg344-2R	CAATGACGAGGGGATAATC		
<i>magA</i>	magA-F	GGTGCTCTTTACATCATTGC	1283	Nadasy et al., 2007
	magA-R	GCAATGGCCATTTGCGTTAG		
<i>wzyK2</i>	wzyK2-F	GACCCGATATTCATACTTGACAGAG	641	Turton et al., 2008
	wzyK2-R	CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC		

Примечание. * — продукт амплификации может быть представлен несколькими последовательностями разного размера.

Note. * — amplicons can be of different sizes.

зую соответствующие режимы реакций [20, 38]. Амплификацию, визуализацию полос и документирование данных осуществляли аналогично вышесказанному. Все воспроизводимые полосы оценивались вручную и анализировались. Была создана матрица данных (0/1), которая в дальнейшем использовалась для построения дендрограммы с использованием метода иерархической кластеризации (UPGMA — невзвешенный метод парных групп с арифметическими средними) с программным обеспечением DARwin 6.0.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica v.10. Для выявления статистически значимых различий использовали χ^2 (с поправкой Йейтса) или точный критерий Фишера (F-test). Для оценки значимости признака вычисляли отношение шансов (OR) с определением 95%-ного доверительного интервала.

Результаты

Фенотипическая характеристика устойчивости к антибиотикам изолятов *K. pneumoniae*. Проведенное исследование показало, что большинство культур *K. pneumoniae* имело значительный уровень резистентности к протестированным антибиотикам. Все изоляты были устойчивы к ампициллину. К цефотаксиму, цефтазидиму, цефтриаксону, цефепиму, ампициллину-сульбактаму оказались нечувствительными 90% изолятов, а к амоксициллину/клавулановой кислоте — 84%. Кроме того, 88% изолятов проявляли устойчивость к ципрофлоксацину и левофлоксацину, тогда как 76% были устойчивы к имипенему и меропенему. Самый низкий уровень резистентности был обнаружен для гентамицина (58%) и амикацина (46%). Среди 50 изолятов *K. pneumoniae* фенотип продукции БЛРС имели 90% культур. Большинство штаммов (88%) имели фенотип МЛУ. При распределении культур с учетом профиля отделения, оказалось, что встречаемость антибиотикорезистентных культур была выше в ОАиР (табл. 2). Так, шанс встретить в ОАиР изоляты, устойчивые к карбапенемам, был выше в 4,9 раз, к ципрофлоксацину — в 3,9 раз, к амикацину — в 2,6 раза, чем в кардиохирургических отделениях. Кроме того, *K. pneumoniae*, нечувствительные к амоксициллину/клавуланату, а также карбапенемам, достоверно чаще встречались в ОАиР, чем в КХО (F-test: $p = 0,041$ и $p = 0,038$ соответственно). МЛУ-изоляты, а также культуры с фенотипом БЛРС были равномерно распределены между выборками штаммов, изолированных от пациентов с клиническими проявлениями инфекции и бессимптомным носительством. Тем

не менее шанс выделить культуры с фенотипом БЛРС был выше у пациентов с клиническими проявлениями клебсиеллезной инфекции (OR = 6,000).

Молекулярная характеристика устойчивости к бета-лактамам антибиотикам изолятов *K. pneumoniae*. Учитывая высокую устойчивость культур к бета-лактамам антибиотикам, представляло интерес оценить встречаемость бета-лактамаз с наибольшей клинической значимостью. Все культуры содержали хотя бы один ген, детерминирующий устойчивость к бета-лактамам антибиотикам, а 40% ($n = 20$) культур содержали 5 и более генов резистентности одновременно. Подавляющее большинство изолятов содержали ген bla_{TEM} (95,6% БЛРС-положительных изолятов, 96% всех культур). Детерминанты bla_{CTX-M} , bla_{OXA} и bla_{SHV} в различных комбинациях были детектированы в 91,1/82% ($n = 41$), 75,6/68% ($n = 34$) и 42,2/40% ($n = 19$) случаев соответственно. Анализ разнообразия генов БЛРС показал, что большинство БЛРС-положительных изолятов *K. pneumoniae* (91,1%) чаще содержали комбинации двух и более генов. Наиболее распространенной была комбинация $bla_{CTX-M} + bla_{TEM} + bla_{OXA}$, встречающаяся, в том числе с другими генами, у 40% ($n = 18$). Необходимо отметить, что все фенотипически БЛРС-негативные культуры содержали только фрагменты bla_{TEM} и в одном случае — комбинацию $bla_{TEM} + bla_{SHV}$. Детерминанты bla_{VIM-2} и bla_{NDM-1} встречались в 68,9/62% ($n = 31$) и 42,2/38% ($n = 19$) случаев соответственно. Комбинацию генов $bla_{VIM-2} + bla_{NDM-1}$ содержали 37,8/34% ($n = 17$) изолятов. Ген bla_{KPC} был детектирован только у трех изолятов (№ 5, 6, 20), имеющих идентичные генетические профили (см. ниже). Ни один изолят не имел ген bla_{IMP-1} . Все индивидуальные комбинации генов бета-лактамаз представлены в табл. 3.

В целом распространенность генов бета-лактамаз (за исключением bla_{SHV}) была выше в изолятах группы «ОАиР». Так, шанс детектировать в данной субпопуляции *K. pneumoniae* карбапенемазу bla_{NDM-1} был в 3,5 раз, а bla_{VIM-2} — в 2,7 раз выше, чем среди культур из хирургических отделений. Стоит отметить, что *K. pneumoniae*, продуцирующие бета-лактамазу КРС, были выделены только от пациентов с признаками инфекции, кроме того, в данной группе достоверно чаще встречались продуценты металло-бета-лактамазы NDM-1 (53,6% vs 18,2%: $p = 0,02$, F-тест).

Интегроны 1 класса с молекулярной массой от 800 до 2500 п.н. были выявлены у 32 изолятов (64%). Интегроны достоверно чаще детектировали в группе карбапенеморезистентных культур, чем у чувствительных изолятов (81,6% vs 8,3%, $p < 0,01$; F-тест).

Таблица 2. Распространенность устойчивости к антибиотикам среди изолятов *K. pneumoniae* (n = 50)Table 2. Prevalence of antibiotic resistance among *K. pneumoniae* isolates (n = 50)

Антибиотик Antibiotic	Количество изолятов, n (%) Number of isolates, n (%)			Отношение шансов (OR) Odds ratio
	Общее (n = 50) General (n = 50)	ОАиР (n = 31) Department of anesthesiology and reanimation (n = 31)	Хирургические отделения (n = 19) Cardiac surgery department (n = 19)	
Ампициллин/Ampicillin	50 (100,0)	31 (100)	19 (100)	–
Цефотаксим/Cefotaxime	45 (90,0)	29 (93,5)	16 (84,2)	2,7
Цефтазидим/Ceftazidime				
Цефтриаксон/Ceftriaxone				
Цефепим/Cefepime	38 (76,0)	27 (87,1)*	11 (57,9)	4,9
Меропенем/Meropenem				
Имипенем/Imipenem	45 (90,0)	29 (93,5)	16 (84,2)	2,7
Ампициллин/сульбактам Ampicillin/sulbactam				
Амоксициллин/клавуланат Amoxicillin/clavulanate	42 (84,0)	29 (93,5)*	13 (68,4)	6,6
Ципрофлоксацин/Ciprofloxacin	44 (88,0)	29 (93,5)	15 (78,9)	3,8
Левифлоксацин/Levofloxacin				
Амикацин/Amikacin	23 (46,0)	17 (54,3)	6 (31,6)	2,6
Гентамицин/Gentamicin	29 (58,0)	20 (64,5)	9 (47,4)	2,0
Фенотип БЛРС/ESBL phenotype	45 (90,0)	29 (93,5)	16 (84,2)	2,7
Фенотип МЛУ/MDR phenotype	44 (88,0)	29 (93,5)	15 (78,9)	3,8

Примечание. * — встречаемость в выборке достоверно выше (p < 0,01, F-тест).

Note. * — sample occurrence is significantly higher (p < 0.01, F-test).

Таблица 3. Встречаемость индивидуальных комбинаций генов, кодирующих БЛРС и карбапенемазы, среди изолятов *K. pneumoniae*Table 3. Rate of individual combinations of ESBL and carbapenemase-encoding genes among *K. pneumoniae* isolates

БЛРС-генотип ESBL genotype	n (% от БЛРС/ % от всех изолятов) n (% of ESBL/% of all isolates)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA}	8 (17,8/16,0)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>bla</i> _{NDM-1}	7 (15,6/14,0)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>bla</i> _{NDM-1}	5 (11,1/10,0)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{VIM-2}	5 (11,1/10,0)
<i>bla</i> _{TEM}	4 (8,9/8,0)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{VIM-2}	3 (6,7/6,0)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{KPC} + <i>bla</i> _{VIM-2}	3 (6,7/6,0)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>bla</i> _{NDM-1}	3 (6,7/6,0)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>bla</i> _{NDM-1}	2 (4,4/4,0)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{NDM-1}	2 (4,4/4,0)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{SHV}	2 (4,4/4,0)
<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{VIM-2}	2 (4,4/4,0)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M}	2 (4,4/4,0)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV}	1 (2,2/2,0)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{VIM-2}	1 (2,2/2,0)

Характеристика гипервирулентного фенотипа и генотипа изолятов *K. pneumoniae*. Исследуемые культуры протестировали на присутствии 3 генов, являющихся маркерами гипервирулентного патотипа, а также идентифицировали тип капсулы. Согласно результатам стринг-теста, гипермукоидный фенотип имели всего 8% (n = 4) изолятов *K. pneumoniae* (табл. 4). Хотя бы один ген гипервирулентности был детектирован у большинства (n = 27) изолятов. Наиболее распространенным оказался ген-маркер *iucA*, амплифицированный у 54% (n = 27) *K. pneumoniae*, *prmpA* детектировали у 38% (n = 19) культур. Лишь у 10% (n = 5) изолятов была обнаружена комбинация трех генов-маркеров гипервирулентности *prmpA*+*iucA*+*peg-344*, причем именно эти культуры были положительными в стринг-тесте. Результаты генетического анализа показали, что 4% (n = 2) культур содержали ген *magA*, 44% (n = 22) — ген *wzyK2*, детерминирующие капсулы типа K1 и K2 соответственно, прочие изоляты имели капсулы иного типа, не определяемые в данном исследовании. Все индивидуальные комбинации генов, ассоциированных с гипервирулентностью и капсулообразованием, представлены в табл. 4.

Гипермукоидный фенотип имели только чувствительные к карбапенемам культуры *K. pneumoniae*, их распространенность в данной группе составила 18,2% (4 из 22). Культуры, имеющие капсульный тип K1, также были де-

тектированы только в группе чувствительных к карбапенемам, тогда как тип К2 был наиболее распространен среди устойчивых к карбапенемам *K. pneumoniae* ($p = 0,04$; F-тест).

Интересно, что представленность детерминант гипервирулентности оказалась ниже в изолятах группы «ОАиР», чем в хирургических отделениях, а *K. pneumoniae*, имеющие мукоидный фенотип, встречались только у пациентов хирургических отделений КХО № 1 и КХО № 2 (табл. 5). Кроме того, стоит отметить, что шанс встретить изоляты с гипермукоидным фенотипом у пациентов с клиническими проявлениями инфекции был в 2,5 раза выше, чем без признаков таковой (OR = 2,520). *K. pneumoniae*, содержащие детерминанты гипервирулентности *prmpA* и *iucA*, встречались соответственно в 2,3 раза (46,4% vs 27,3%; OR = 2,311) и в 2,6 раз (64,3% vs 40,9%; OR = 2,600) чаще в группе с признаками инфекции (однако разница не была достоверной).

Молекулярно-генетическое типирование изолятов *K. pneumoniae*. Проведенное молекулярное типирование показало, что 76% изолятов ($n = 38$) имели индивидуальные RAPD/ERIC-профили, а 24% культур ($n = 12$) распределились в 4 геном-группы идентичных изолятов (I — изоляты; II — 48 и 49; III — 11, 23 и 47; IV — 12 и 17). На дендрограмме UPGMA генетического сходства на основе повторяющихся ERIC-последовательностей 50 изолятов распределились в 2 основных кластера: кластер А ($n = 23$) и кластер Б ($n = 26$) (рис., III обложка). Первый кластер может быть разделен на 2 подкластера — 1А (№ 43, 9, 50, 10, 8, 20, 5, 6, 25, 21, 14, 15, 4, 18, 13) и 2А (№ 39, 35, 40, 26, 45, 37, 48, 49), каждый из которых включал несколько клональных линий, а один изолят (№ 36)

Таблица 4. Встречаемость индивидуальных комбинаций генов, ассоциированных с гипервирулентностью и капсулообразованием, среди изолятов *K. pneumoniae*

Table 4. The occurrence of individual combinations for hypervirulence- and capsule formation-associated genes among *K. pneumoniae* isolates

Генотип гипервирулентности Hypervirulence genotype	n (%)
<i>prmpA+iucA</i>	4 (8,0)
<i>wzyK2</i>	11 (22,0)
<i>wzyK2+prmpA+iucA</i>	10 (20,0)
<i>iucA</i>	8 (16,0)
<i>prmpA+iucA+peg-344</i>	2 (4,0)
<i>magA+prmpA+iucA+peg-344</i>	2 (4,0)
<i>wzyK2+prmpA+iucA+peg-344</i>	1 (2,0)
Гипермукоидный фенотип Hypermucoviscous phenotype	4 (8,0)

имел уникальный профиль. Кластер Б также включал два подкластера: 1Б (№ 38, 27, 44, 30, 41, 42, 32, 31, 33, 47, 23, 11, 29, 16, 24, 2, 1) и 2Б (№ 46, 22, 34, 28, 7, 3, 17, 12, 19) с разной степенью сходства изолятов. Коэффициент несходства между изолятами в пределах одной клональной линии колебался от 0,00 до 0,20 (например, между изолятами № 43, 9, 50, 10, 8), что указывает на то, что изоляты принадлежали к одной линии и были близкородственными.

Сравнение чувствительность к антибактериальным препаратам изолятов двух кластеров не выявило существенного различия между

Таблица 5. Распространенность генов и капсул, ассоциированных с гипервирулентностью, среди изолятов *K. pneumoniae* в зависимости от профиля отделения

Table 5. The prevalence of hypervirulence- and capsule formation-associated genes among *K. pneumoniae* isolates related to department specialization

Характеристика гипервирулентности Characterization of hypervirulence	Количество изолятов, n (%) Number of isolates, n (%)		Отношение шансов (OR) Odds ratio
	ОАиР (n = 31) Department of anesthesiology and reanimation (n = 31)	Хирургические отделения (n = 19) Cardiac surgery department (n = 19)	
<i>prmpA</i>	9 (29)	10 (52)	2,3
<i>iucA</i>	16 (51,6)	11 (57,9)	2,6
<i>peg-344</i>	1 (3,2)	4 (21,1)	8,0
<i>prmpA+iucA+peg-344</i>	1 (3,2)	4 (21,1)	8,0
Капсула типа К1 K1 type capsule	1 (3,2)	1 (5,3)	–
Капсула типа К2 K2 type capsule	12 (38,7)	10 (52,6)	1,7
Гипермукоидный фенотип Hypermucoviscous phenotype	0	4 (21,1)*	–

Примечание. * — встречаемость в выборке достоверно выше ($p < 0,01$, F-тест).

Note. * — sample occurrence is significantly higher ($p < 0.01$, F-test).

ними, при этом культуры, содержащие *bla*_{КРС} встречались только в кластере А, и достоверно чаще в этой группе встречались гены *bla*_{VIM-2} ($p = 0,016$; F-тест) и *bla*_{SHV} ($p = 0,004$; F-тест). Шанс встретить изоляты с гипервирулентным генотипом (*prmpA+iucA+peg-344*), напротив, был в 4 раза выше в кластере Б.

Следует отметить, что изоляты, отнесенные к кластеру А, встречались во всех отделениях, тогда как культуры кластера Б не встречались в отделениях кардиохирургии № 3 и № 4. К кластеру Б принадлежали 61,5% ($n = 16$) всех культур, выделенных от пациентов отделения реанимации.

Обсуждение

K. pneumoniae — распространенный грамотрицательный условно-патогенный микроорганизм, вызывающий различные формы ИСМП, в том числе септицемию, пневмонию, инфекции мочевыводящих путей, менингит и абсцессы различной локализации [32]. Многочисленными исследованиями показано, что множественная антибиотикорезистентность является характерным свойством современных штаммов *K. pneumoniae*, и, наряду с другими возбудителями с высокой устойчивостью к используемым в клинике антибиотикам, отнесена центром США по контролю и профилактике заболеваний (CDC) к критически важным ESKAPE-патогенам [30]. Рост устойчивости к противомикробным препаратам у представителей гипервирулентного патотипа *K. pneumoniae* диктует необходимость оптимизации инфекционного контроля и усовершенствование лабораторной диагностики нозокомиальных инфекций, что предполагает использование современных и рациональных подходов и методов при проведении микробиологического мониторинга. Этот аспект имеет существенное значение в кардиохирургических стационарах, так как лечение инфекций у высокоиммунокомпрометированных пациентов является чрезвычайно сложной задачей [31]. Ранее нами были получены результаты, указывающие на возможность концентрирования/персистенции в кардиохирургическом стационаре штаммов *K. pneumoniae* с множественной резистентностью к антибиотикам, в том числе экстремально резистентных и панрезистентных бактерий [7]. Продолжением работы явилось настоящее исследование, в котором у собранной в течение года в кардиохирургическом стационаре коллекции культур *K. pneumoniae* были изучены маркеры гипервирулентного патотипа, идентифицирован тип капсулы, оценена распространенность и доминирующие типы лактамаз, а также определена родственность изолятов.

Среди энтеробактерий клинически значимыми бета-лактамазами являются ферменты следующих молекулярных классов по Ambler: класса А (типы SHV, TEM, CTX-M, PER, KPC, GES), класса В (типы IMP, VIM, NDM, GIM, SIM), С (типы CMY, FOX, MOX, DHA) и D (тип OXA). Gorrie C.L. и соавт. (2022) показали более высокую частоту внутрибольничного инфицирования БЛРС-положительными штаммами *K. pneumoniae* по сравнению с БЛРС-отрицательными [17]. В нашем исследовании фенотип БЛРС имели 90% изученных культур, что может косвенно свидетельствовать о закреплении и персистенции данных бактерий в условиях кардиохирургического стационара. Штаммы клебсиелл, продуцирующие карбапенемазы, часто связаны с внутрибольничными инфекциями и вспышечной заболеваемостью [10, 12, 19]. Инфекции, вызванные продуцирующими карбапенемазы и/или полирезистентными *K. pneumoniae*, существенно осложняют лечение и ассоциируются с высокой смертностью пациентов кардиохирургических стационаров [3, 15, 31]. Карбапенемоустойчивые изоляты, выделенные от пациентов кардиохирургического стационара г. Перми, составили почти 76% всех культур. Устойчивость была опосредована продукцией металло-бета-лактамаз типов VIM и NDM, а также лактамазой КРС. Следует отметить, что доля карбапенемоустойчивых изолятов, содержащих *bla*_{VIM-2}, *bla*_{NDM-1} и *bla*_{КРС} составила 81,6% (31 из 38), 50% (19 из 38) и 7,9% (3 из 38). Согласно Lombardi и соавт. (2015) распространенность карбапенемоустойчивых изолятов *K. pneumoniae* в кардиохирургическом отделении стационара г. Санданато-Миланезе (Италия), составила 35% [25]. Интересно, что устойчивость культур чаще была связана с продукцией *bla*_{КРС} (90,8%), тогда как встречаемость *bla*_{VIM-2} составила лишь 9,2%. Нозокомиальные штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие карбапенемазы NDM-типа, активно выделяются в стационарах России [3, 4]. Так, среди изолятов *K. pneumoniae*, циркулирующих в стационарах Санкт-Петербурга, частота распространения продукции карбапенемаз достигала 9,2%, при этом чаще всего обнаруживали NDM-тип карбапенемазы [4]. Следует отметить, что продуценты карбапенемаз IMP типа в нашем исследовании не были детектированы. Известно, что гены бета-лактамаз/карбапенемаз *K. pneumoniae* часто переносятся в составе интегронов [5]. По данным Ou Qin и соавт. (2017), интегроны I класса были обнаружены у 77,8% карбапенеморезистентных штаммов *K. pneumoniae* [35]. В нашем исследовании интегроны I класса достоверно чаще детектировали в группе устойчивых к карбапенемам культур, чем у чувствительных изолятов.

На современном этапе отмечается глобальное распространение гипервирулентной *K. pneumoniae*. Если ранее случаи инфицирования такими штаммами были описаны только у здоровых людей вне стационаров, то сегодня они все чаще становятся ответственными за внутрибольничные инфекции [24, 36, 37]. Для оценки вирулентности клебсиелл используют экспериментальную инфекционную модель на мышах или морфологический стринг-тест, позволяющий выявить гипермукоидный фенотип. Первый вариант является трудоемким и сложно воспроизводимым в условиях практических клинических лабораторий, второй — достаточно простой в исполнении тест, однако корреляция этого признака с гипервирулентностью составляет не более 90% [1]. Гипервирулентность бактерий *K. pneumoniae* опосредована генами на большой плазмиде вирулентности или внутри хромосомных островков патогенности [36]. Известно несколько генов, которые, продемонстрировали диагностическую точность > 0,95 для идентификации гипервирулентных штаммов: *iucA* (участвует в биосинтезе сидерофора аэробактерина), переносимый плазмидой ген *prmpA* (ассоциируется с гипермукоидным фенотипом клебсиелл), *peg-344* (предполагаемый переносчик) [37]. Кроме того, значительный вклад в вирулентность *K. pneumoniae* вносит капсула, поскольку культуры серотипов K1 и K2 более устойчивы к фагоцитозу, чем штаммы не K1/K2 [39]. Хромосомный ген *magA* (ассоциирован с вязкостью слизи) и ген *wzyK2* (кодирует поверхностный белок, участвующий в сборке капсулы на наружной мембране клетки) часто детектируют у представителей серотипов K1 и K2 соответственно. В данной работе мы оценили выделенные в кардиохирургическом стационаре изоляты на наличие этих генов, маркирующих гипервирулентный патотип (*prmpA*, *iucA*, *peg-344* и *magA*, *wzyK2*). Ген *rmpA* был выявлен у 19 (38%) культур, что оказалось несколько неожиданным, поскольку гипермукоидным фенотипом обладали только 5 (10%) изолятов. В исследованиях Семеновой и соавт. (2020) показано, что гипервирулентными оказались 11,4% нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae*, но необходимо отметить, что авторы считали гипервирулентными только штаммы, положительные в фенотипическом тесте и *rmpA*⁺ [6]. Исследования Russo и соавт. (2018) выявили наибольшую значимость продукции аэробактерина для проявления вирулентных свойств, и на основании этих данных авторы сделали вывод, что наличие двух генов, *iucA* и *rmpA*, является достаточным для формирования гипервирулентного фенотипа [37]. В нашем исследовании почти треть

(28%) изученных изолятов содержала комбинацию генов *rmpA* и *iucA*, при этом выделяли их чаще в группе пациентов с активной инфекцией. Следует отметить, что 48% культур имели капсулы типа K1/K2, которые, по некоторым данным, играют более важную роль в определении гипервирулентности *K. pneumoniae*, чем *rmpA* [14, 40]. Таким образом, молекулярно-генетическая характеристика исследуемых изолятов показала, что они обладали гетерогенным набором детерминант, ассоциированных с гипервирулентностью. В нашем исследовании гипермукоидный фенотип, капсульный тип K1 и комбинацию генов *prmpA*, *iucA*, *peg-344* имели только чувствительные к карбапенемам культуры, а капсульный тип K2 был наиболее распространен среди устойчивых к карбапенемам *K. pneumoniae*.

Молекулярные методы широко используются для субвидового типирования и определения родства (клональности) выделенных изолятов микроорганизмов, что особенно важно при проведении микробиологического мониторинга. Ряд гер-ПЦР реакций [20, 38], основанных на амплификации повторяющихся последовательностей, являются оптимальными для быстрой оценки локальной эпидемиологической ситуации в медицинских организациях. При дифференцировке нозокомиальных изолятов *K. pneumoniae* показана высокая разрешающая способность метода ERIC-ПЦР, который оказался даже более надежным по сравнению с MALDI-ToF [21, 34]. В случае длительного мониторинга и накопления большого количества образцов из разных источников для определения сходства изолятов обычно используют более одного маркера генетического типирования [28]. Методы ERIC-ПЦР и гер-ПЦР с праймером M13 (в качестве арбитражного) были успешно задействованы для оценки распространенности циркулирующих в российских стационарах штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae*, продуцирующих бета-лактамазы CTX-типа [13]. В нашем исследовании на основании типирования с праймерами ERIC и M13 выявлено, что 76% культур *K. pneumoniae* имели индивидуальные профили. Все культуры распределились в 2 основных кластера, каждый из которых включал несколько клональных линий с разной степенью сходства изолятов. Эти результаты согласуются с данными ряда исследований, в которых представлено высокое генетическое разнообразие *K. pneumoniae*, изолированных от пациентов стационаров [39]. При этом в условиях госпитальной среды часто определяют клональную популяционную структуру изолятов. Так, исследование изолятов *K. pneumoniae*, полученных от пациентов с COVID-19, находящихся в отделении интенсивной терапии специа-

лизированного госпиталя в Иране, показало, что 44,2% из них имеют генетическое сходство и могут быть объединены в три основных кластера, между которыми выявлена значительная разница в отношении устойчивости к противомикробным препаратам [16]. В нашей работе мы также наблюдали некоторую разницу в отношении устойчивости к антибиотикам между кластерами А и Б. Штаммы одного кластера в целом были более устойчивыми ко всем протестированным антибиотикам (100% фенотип МЛУ), достоверно чаще были резистентны к амикацину, тогда как представители кластера Б чаще были носителями гена *peg-344* и гипермукоидного фенотипа.

Выводы

В данном исследовании представлена микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика изолятов *K. pneumoniae*, циркулирующих в кардиохирургическом стационаре. Возбудители имели гетерогенные генетические профили, были в большинстве случаев мультирезистентными, продуцировали БЛРС и карбапенемазы различных типов. Среди определенных бета-лактамаз наиболее широко были распространены ферменты СТХ-М, VIM-2 и NDM-1, что определяется их эффективной передачей

с различными мобильными генетическими элементами. Обнаружены изоляты с гипермукоидным фенотипом. Потенциально патогенные культуры, содержащие комбинацию генов *rtxA* и *iucA*, составили почти 30% и встречались чаще в группе пациентов с активной инфекцией.

Таким образом, полученные нами результаты по целому ряду позиций совпадают с общемировыми и российскими наблюдениями, характеризующими распространенность и уровень антибиотикочувствительности *K. pneumoniae*, выделенной при нозокомиальной инфекции пациентов хирургических стационаров. Следует отметить факт обнаружения близкородственных изолятов одного кластера у пациентов разных отделений кардиохирургического стационара, что указывает на возможную циркуляцию возбудителя в замкнутом контуре «отделение—ОАиР—отделение». Учитывая, что в России комплексное исследование циркулирующих в кардиохирургическом стационаре изолятов *K. pneumoniae* проведено впервые, а также ограниченные данные по этому вопросу в иностранной литературе, необходим дальнейший анализ результатов с учетом оценки длительности циркуляции культур, определения источника и эпидемиологических цепочек для более полной характеристики эпидемиологического процесса.

Список литературы/References

1. Агеев В.А., Агеев И.В., Сидоренко С.В. Конвергенция множественной резистентности и гипервирулентности у *Klebsiella pneumoniae* // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 450–460. [Ageevets V.A., Ageevets I.V., Sidorenko S.V. Convergence of multiple resistance and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 450–460. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-COM-1825
2. Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Гординская Н.А. Молекулярно-генетическая характеристика карбапенем-устойчивого штамма *Klebsiella pneumoniae* KP254 как представителя эволюционной ветки высоковирулентных штаммов // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 506–516. [Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Gordinskaya N.A. Molecular genetic characteristics of the carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* KP254 strain as a representative of the highly virulent strain evolutionary branch. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 506–516. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MGC-1480
3. Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Липская Л.В., Коноваленко И.Б., Пясетская М.Ф., Курчикова Т.С., Ведерникова Н.Б., Морозова О.Т., Смирнова М.В., Попенко Л.Н., Любушкина М.И., Савочкина Ю.А., Макарова М.А., Сузаева Л.В., Останкова Ю.В., Иванова М.Н., Павелкович А.М., Наабер П., Сепп Э., Кыльялг С., Мицюлявичене И., Балода А. Штаммы энтеробактерий, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра и металло-β-лактамазу *ndm-1*, выделенные в стационарах в странах Балтийского региона // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 1. С. 29–36. [Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Lipskaya L.V., Konovalenko I.B., Pyasetskaya M.F., Kurchikova T.S., Vedernikova N.B., Morozova O.T., Smirnova M.V., Popenko L.N., Lyubushkina M.I., Savochkina Yu.A., Makarova M.A., Suzhaeva L.V., Ostankova Yu.V., Ivanova M.N., Pavelkovich A.M., Naaber P., Sepp E., Kyl'valg S., Mitsyulyavichene I., Balode A. Enterobacteriaceae, producing ESBLs and metallo-β-lactamase *NDM-1*, isolated in hospitals of Baltic region countries. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 29–36. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2013-1-29-36
4. Лазарева И.В., Агеев В.А., Ершова Т.А., Зуева Л.П., Гончаров А.Е., Дарьина М.Г., Светличная Ю.С., Усков А.Н., Сидоренко С.В. Распространение и антибактериальная резистентность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, в Санкт-Петербурге и некоторых других регионах Российской Федерации // Антибиотики и химиотерапия. 2000. Т. 61. С. 11–12. [Lazareva I.V., Ageevets V.A., Ershova T.A., Zueva L.P., Goncharov A.E., Darina M.G., Svetlichnaya Yu.S., Uskov A.N., Sidorenko S.V. Distribution and antibacterial resistance of gram-negative bacteria, producers of carbapenemases, in St. Petersburg and some other regions of the Russian Federation. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2000, vol. 61, pp. 11–12. (In Russ.)]
5. Кузина Е.С., Асташкин Е.И., Лев А.И., Агеева Е.Н., Карцев Н.Н., Светоч Э.А., Фурсова Н.К. Интегроны классов 1 и 2 в госпитальных штаммах грамотрицательных бактерий, выделенных в Москве и регионах Российской Федерации // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2019. Т. 37, № 1. С. 17–24. [Kuzina E.S., Astashkin E.I., Lev A.I.,

- Ageeva E.N., Kartsev N.N., Svetoch E.A., Fursova N.K. Class 1 and class 2 integrons in hospital strains of gram-negative bacteria isolated in Moscow and other regions of the Russian Federation. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2019, vol. 37, no 1, pp. 17–24. (In Russ.)] doi: 10.17116/molgen20193701117
6. 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 K.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. *Rossiyskiy 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
 7. Сергеев В.И., Кудрявцева Л.Г., Пегушина О.Г. Частота выявления и антибиотикорезистентность возбудителей гнойно-септических инфекций // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2022. Т. 21, № 1. С. 74–80. [Sergevni V.I., Kudryavtseva L.G., Pegyshina O.G. Rate of detection and antibiotic resistance pathogens of purulent-septic infections in cardiac surgery patients. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2022, vol. 21, no. 1, pp. 74–80. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2022-21-1-74-80
 8. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Подопригра И.В., Шагин Д.А. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020. Т. 22, № 1. С. 4–19. [Chebotar I.V., Vocharova Yu.A., Podoprigora I.V., Shagin D.A. The reasons why *Klebsiella pneumoniae* becomes a leading opportunistic pathogen. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2020, vol. 22, no. 1, pp. 4–19. (In Russ.)] doi: 10.36488/cmac.2020.1.4-19
 9. Bhatt P.J., Ali M., Rana M., Patel G., Sullivan T., Murphy J., Pinney S., Anyanwu A., Huprikar S., Taimur S. Infections due to multidrug-resistant organisms following heart transplantation: epidemiology, microbiology, and outcomes. *Transpl. Infect. Dis.*, 2020, vol. 22, no. 1: e13215. doi: 10.1111/tid.13215
 10. Gonçalves Barbosa L.C., Silva E Sousa J.A., Bordoni G.P., Barbosa G.O., Carneiro L.C. Elevated mortality risk from CRKp associated with comorbidities: systematic review and meta-analysis. *Antibiotics (Basel)*, 2022, vol. 11, no. 7: 874. doi: 10.3390/antibiotics11070874
 11. Chang D., Sharma L., Dela Cruz C.S., Zhang D. Clinical epidemiology, risk factors, and control strategies of *Klebsiella pneumoniae* infection. *Front. Microbiol.*, 2021, vol. 12: 750662. doi: 10.3389/fmicb.2021.750662
 12. Del Puente F., Giacobbe D.R., Salsano A., Maraolo A.E., Ong D.S.Y., Yusuf E., Tutino S., Marchese A., Santini F., Viscoli C. Epidemiology and outcome of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC-KP) infections in cardiac surgery patients: a brief narrative review. *J. Chemother.*, 2019, vol. 31, no. 7–8, pp. 359–366. doi: 10.1080/1120009X.2019.1685794
 13. Edelstein M., Pimkin M., Palagin I., Edelstein I., Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, vol. 47, no. 12, pp. 3724–3732. doi: 10.1128/aac.47.12.3724-3732.2003
 14. Fang C.T., Chuang Y.P., Shun C.T., Chang S.C., Wang J.T. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J. Exp. Med.*, 2004, vol. 199, no. 5, pp. 697–705. doi: 10.1084/jem.20030857
 15. Galvão L.M., Oliveira A.P.R., Ibanês A.S., Monteiro J., Inoue F., Dantas D.C., Sanchez F., Santos D.W., Abboud C.S. Fatal case of donor-derived colistin-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* transmission in cardiac transplantation. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2018, vol. 22, no. 3, pp. 235–238. doi: 10.1016/j.bjid.2018.04.005
 16. Ghanizadeh A., Najafzade M., Rashki S., Marzhoseyni Z., Motallebi M. Genetic diversity, antimicrobial resistance pattern, and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* Isolated from patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) and ventilator-associated pneumonia. *Biomed. Res. Int.*, 2021, vol. 2021: 2347872. doi: 10.1155/2021/2347872
 17. Gorrie C.L., Mirčeta M., Wick R.R., Judd L.M., Lam M.M.C., Gomi R., Abbott I.J., Thomson N.R., Strugnell R.A., Pratt N.F., Garlick J.S., Watson K.M., Hunter P.C., Pilcher D.V., McGloughlin S.A., Spelman D.W., Wyres K.L., Jenney A.W.J., Holt K.E. Genomic dissection of *Klebsiella pneumoniae* infections in hospital patients reveals insights into an opportunistic pathogen. *Nat. Commun.*, 2022, vol. 13, no. 1: 3017. doi: 10.1038/s41467-022-30717-6
 18. Grigoryev E.V., Shukevich D.L., Matveeva V.G., Korneyuk R.A. Immunosuppression as a component of multiple organ dysfunction syndrome followed cardiac surgery. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*, 2018, vol. 7 no. 4, pp. 84–91. doi: 10.17802/2306-1278-2018-7-4-84-91
 19. Gu D., Dong N., Zheng Z., Lin D., Huang M., Wang L., Chan E.W., Shu L., Yu J., Zhang R., Chen S. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.*, 2018, vol. 18, no. 1, pp. 37–46. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30489-9
 20. Huey B., Hall J., Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.*, 1989, vol. 171, no. 5, pp. 2528–2532. doi: 10.1128/jb.171.5.2528-2532.1989
 21. Kundu J., Kansal S., Rathore S., Kaundal M., Angrup A., Biswal M., Walia K., Ray P., Evaluation of ERIC-PCR and MALDI-TOF as typing tools for multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from a tertiary care center in India. *PLoS One*, 2022, vol. 17, no. 11: e0271652. doi: 10.1371/journal.pone.0271652
 22. Lazareva I., Ageevets V., Sopova J., Lebedeva M., Starkova P., Likholetova D., Gostev V., Moiseenko V., Egorenkov V., Navatskaya A., Mitroshina G., Myasnikova E., Tsvetkova I., Lobzin Y., Sidorenko S. The emergence of hypervirulent blaNDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* sequence type 395 in an oncology hospital. *Infect. Genet. Evol.*, 2020, vol. 85: 104527. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104527
 23. Lev A.I., Astashkin E.I., Kislichkina A.A., Solovieva E.V., Kombarova T.I., Korobova O.V., Ershova O.N., Alexandrova I.A., Malikov V.E., Bogun A.G., Borzilov A.I., Volozhantsev N.V., Svetoch E.A., Fursova N.K. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. *Pathog. Glob. Health.*, 2018, vol. 112, no. 3, pp. 142–151. doi: 10.1080/20477724.2018.1460949
 24. 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

25. Lombardi F., Gaia P., Valaperta R., Cornetta M., Tejada M.R., Di Girolamo L., Moroni A., Ramundo F., Colombo A., Valisi M., Costa E. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: progressive spread and four-year period of observation in a cardiac surgery division. *Biomed. Res. Int.*, 2015, vol. 2015: 871947. doi: 10.1155/2015/871947
26. 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, pp. 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
27. Martin R.M., Bachman M.A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2018, vol. 8, no. 4. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004
28. Meacham K.J., Zhang L., Foxman B., Bauer R.J., Marrs C.F. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, no. 11, pp. 5224–5226. doi: 10.1128/JCM.41.11.5224-5226.2003
29. Navon-Venezia S., Kondratyeva K., Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2017, vol. 41, no. 3, pp. 252–275. doi: 10.1093/femsre/fux013
30. Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.*, 2013, vol. 11, no. 3, pp. 297–308. doi: 10.1586/eri.13.12
31. Pierce G., Resch C., Mourin M., Dibrov P., Dibrov E., Ravandi A. Bacteria and the growing threat of multidrug resistance for invasive cardiac interventions. *Rev. Cardiovasc. Med.*, 2022, vol. 23, no. 1: 15. doi: 10.31083/j.rcm2301015
32. Podschun R., Ullmann U. *Klebsiella* spp as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, vol. 11, no. 4, pp. 589–603. doi: 10.1128/CMR.11.4.589
33. Poerio N., Olimpieri T., Henrici De Angelis L., De Santis F., Thaller M.C., D'Andrea M.M., Fraziano M. Fighting MDR-*Klebsiella pneumoniae* infections by a combined host- and pathogen-directed therapeutic approach. *Front. Immunol.*, 2022, vol. 13: 835417. doi: 10.3389/fimmu.2022.835417
34. Purighalla S., Esakimuthu S., Reddy M., Varghese G.K., Richard V.S., Sambandamurthy V.K. Discriminatory power of three typing techniques in determining relatedness of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary hospital in India. *Indian. J. Med. Microbiol.*, 2017, vol. 35, no. 3, pp. 361–368. doi: 10.4103/ijmm.IJMM_16_308
35. Qin Ou, Wenfang Li, Bei Li, Chunfang Yu. Prevalence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) and the distribution of Class 1 Integron in their strains isolated from a hospital in Central China. *Chin. Med. Sci. J.*, 2017, vol. 32, no. 2, pp. 107–112. doi: 10.24920/J1001-9294.2017.018
36. Russo T.A., Marr C.M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2019, vol. 32, no 3, pp. e00001–e000019. doi: 10.1128/CMR.00001-19
37. Russo T.A., Olson R., Fang C.T., Stoesser N., Miller M., MacDonald U., Hutson A., Barker J.H., La Hoz R.M., Johnson J.R. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 2018, vol. 56, no. 9. doi: 10.1128/JCM.00776-18
38. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol. 19, pp. 6823–6831. doi: 10.1093/nar/19.24.6823
39. Wang Q., Li B., Tsang A.K., Yi Y., Woo P.C., Liu C.H. Genotypic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Beijing Hospital reveals high genetic diversity and clonal population structure of drug-resistant isolates. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 2: e57091. doi: 10.1371/journal.pone.0057091
40. Yeh K.M., Kurup A., Siu L.K., Koh Y.L., Fung C.P., Lin J.C., Chen T.L., Chang F.Y., Koh T.H. Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, vol. 45, no. 2, pp. 466–471. doi: 10.1128/JCM.01150-06

Авторы:

Кузнецова М.В., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия;

Сергеев В.И., д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии и гигиены ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера МЗ РФ, г. Пермь, Россия;

Михайловская В.С., бакалавр, инженер лаборатории молекулярной биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия;

Кудрявцева Л.Г., к.м.н., врач-эпидемиолог, зав. эпидемиологическим отделом Федерального центра сердечно-сосудистой хирургии имени С.Г. Суханова МЗ России, г. Пермь, Россия;

Пегушина О.Г., врач-бактериолог Федерального центра сердечно-сосудистой хирургии имени С.Г. Суханова МЗ России, г. Пермь, Россия.

Authors:

Kuznetsova M.V., DSc (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation;

Sergevni V.I., DSc (Medicine), Professor, Department of Epidemiology and Hygiene, Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation;

Mikhailovskaya V.S., Bachelor, Engineer, Laboratory of Molecular Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation;

Kudryavtseva L.G., PhD (Medicine), Head of the Epidemiological Department, Doctor-Epidemiologist, Federal Center for Cardiovascular Surgery named after S.G. Sukhanov, Perm, Russian Federation;

Pegushina O.G., Bacteriologist, Federal Center for Cardiovascular Surgery named after S.G. Sukhanov, Perm, Russian Federation.

IMMUNE SYSTEM PARAMETERS IN PATIENTS WITH CHRONIC OPISTHORCHIASIS BASED ON GENETIC POLYMORPHISM ASSOCIATED WITH CARBOHYDRATE AND LIPID METABOLISM DISORDERS

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

Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation

Abstract. A study assessing differences in the immunopathogenesis of chronic opisthorchiasis with or without genetic polymorphisms in patients associated with predisposition to type II diabetes mellitus and lipid metabolism disorders was carried out. Venous blood samples from 89 patients were collected to analyze immunological parameters and genetic polymorphisms by using pyrosequencing. In the presence of mutations affecting regulation of carbohydrate metabolism, patients with opisthorchiasis had less pronouncedly increased phagocytic activity, a lower monocyte count, higher total T-lymphocyte count, lower T-cytotoxic cell and B-lymphocyte counts, lower IgA, IgG but higher IgM concentration. This indicates a moderately compromised nonspecific resistance, imbalanced effector T- and B-immunity, but in most cases (PPARG, TCF7L2 rs12255372, CDKAL1, CDKN2A/2B, SLC30A8) aggravated humoral immune reaction to invasion particularly revealed by lower B-lymphocyte count. The presence of polymorphisms that alter lipid metabolism regulation bidirectionally affects the parameters of immune response. An increased B-lymphocyte count and other indicators of humoral immune activation to invasion, which are detected in groups with mutations in the APOE (rs429358), PCSK9, ABCA1, APOC3 rs2854117 genes, can contribute to a more effective response to sustained antigenic stimulation. Changes in the T-lymphocytes subpopulations, characteristic of opisthorchiasis invasion, are aggravated in the presence of mutations in the PCSK9, ABCA1, and APOC3 rs2854117 genes. Mutations in the genes APOC3 rs5128, LPL rs268 activate patients' nonspecific resistance, although this effect may also be associated with exhaustion of neutrophil bactericidal reserve. In general, minor alleles of the APOE (rs429358), APOC3 rs2854117, LPL rs268, LPL rs328, PON1 rs662 genes can be considered “protective” for the immunopathogenesis of chronic opisthorchiasis. Thus, patients with chronic opisthorchiasis with different genotypes predisposing to carbohydrate and lipid metabolism disorders had significant differences in immune system parameters, which can also affect the disease course. Mutations in different loci of the PCSK9, ABCA1, APOE, APOC3, and PON1 genes have opposite effects on the analyzed immune parameters. In the presence of mutations in other genes (PPARG, TCF7L2 rs12255372, CDKAL1, CDKN2A/2B, SLC30A8, LPL), opisthorchiasis invasion leads to more pronounced alterations in immune response;

Адрес для переписки:

Бакштановская Ирина Владимировна
625026, Россия, г. Тюмень, ул. Республики, 147,
ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (3452) 28-99-93 (доб. 1070). Факс: 8 (3452) 28-99-92.
E-mail: info@Tniikip.rosпотребнадzor.ru,
BakshtanovskayaIV@Tniikip.rosпотребнадzor.ru

Contacts:

Irina V. Bakshtanovskaya
625026, Russian Federation, Tyumen, Republic str., 147,
Tyumen Region Infection Pathology Research Institute.
Phone: 8 (3452) 28-99-93 (add. 1070). Fax: 8 (3452) 28-99-92.
E-mail: info@Tniikip.rosпотребнадzor.ru,
BakshtanovskayaIV@Tniikip.rosпотребнадzor.ru

Для цитирования:

Бакштановская И.В., Григорьева С.А., Степанова К.Б., Степанова Т.Ф., Озерова А.Н., Калгина Г.А., Курлаева Л.В. Показатели иммунной системы у больных хроническим описторхозом в зависимости от генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями углеводного и липидного обмена // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 115–124. doi: 10.15789/2220-7619-ISP-13304

Citation:

Bakshtanovskaya I.V., Grigorieva S.A., Stepanova K.B., Stepanova T.F., Ozerova A.N., Kalgina G.A., Kurlaeva L.V. Immune system parameters in patients with chronic opisthorchiasis based on genetic polymorphism associated with carbohydrate and lipid metabolism disorders // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 115–124. doi: 10.15789/2220-7619-ISP-13304

mutations in the lipoprotein lipase gene may have some “protective” immune-related effect in opisthorchiasis. The effect of all studied genetic polymorphisms associated with a predisposition to developing type II diabetes mellitus was predominantly negative.

Key words: immune system indicators, chronic opisthorchiasis, genetic polymorphisms, lipid metabolism disorders, diabetes mellitus type II, innate immunity, adaptive immunity.

ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ОПИСТОРХОЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НАРУШЕНИЯМИ УГЛЕВОДНОГО И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

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

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

Резюме. Проведено исследование различий в иммунопатогенезе хронического описторхоза при наличии и отсутствии у больных генетических полиморфизмов, связанных с предрасположенностью к сахарному диабету II типа и нарушениям обмена липидов. В образцах венозной крови 89 пациентов определяли комплекс иммунологических показателей, генетические полиморфизмы выявляли методом пиросеквенирования. При наличии мутаций, изменяющих регуляцию углеводного обмена, у больных описторхозом выявлены: менее выраженное повышение фагоцитарной активности, меньшее количество моноцитов, большее общее количество Т-лимфоцитов, меньшее количество Т-цитотоксических клеток и содержание В-лимфоцитов, меньшая концентрация IgA, IgG и большая — IgM. Это свидетельствует об умеренной недостаточности неспецифической резистентности, дисбалансе эффекторного Т- и В-звеньев иммунитета, но в большинстве случаев (PPARG, TCF7L2 rs12255372, CDKAL1, CDKN2A/2B, SLC30A8) — об усугублении реакции гуморального иммунитета на инвазию, в частности, меньшем числе В-лимфоцитов. Наличие полиморфизмов, нарушающих регуляцию липидного обмена, разнонаправленно влияет на показатели иммунного ответа. Повышенное количество В-лимфоцитов и другие показатели активации гуморального звена иммунитета в ответ на инвазию, которые выявляются в группах с наличием мутаций в генах APOE (rs429358), PCSK9, ABCA1, APOC3 rs2854117, могут способствовать более эффективной реакции на постоянную антигенную стимуляцию. Изменения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, характерные для описторхозной инвазии, усугубляются при наличии мутаций в генах PCSK9, ABCA1, APOC3 rs2854117. Мутации в генах APOC3 rs5128, LPL rs268 активируют неспецифическую резистентность больных, хотя этот эффект может быть связан и с истощением бактерицидного резерва нейтрофилов. В целом, «протективными» для иммунопатогенеза хронического описторхоза можно считать минорные аллели генов APOE (rs429358), APOC3 rs2854117, LPL rs268, LPL rs328, PON1 rs662. Таким образом, у больных хроническим описторхозом с разными генотипами, предрасполагающими к нарушениям углеводного и липидного обмена, выявлены существенные различия в показателях функций иммунной системы, что может влиять и на течение болезни. Мутации в разных локусах генов PCSK9, ABCA1, APOE, APOC3 и PON1 оказывают противонаправленное воздействие на исследованные показатели иммунного ответа. При наличии мутаций в других генах (PPARG, TCF7L2 rs12255372, CDKAL1, CDKN2A/2B, SLC30A8, LPL) описторхозная инвазия приводит к более выраженным отклонениям иммунного реагирования; мутации в гене липопротеиновой липазы, возможно, оказывают некоторый «протективный» эффект на иммунную систему больных описторхозом. Эффект всех исследованных генетических полиморфизмов, связанных с предрасположенностью к развитию сахарного диабета II типа, оказался преимущественно негативным.

Ключевые слова: показатели иммунной системы, хронический описторхоз, генетические полиморфизмы, нарушения липидного обмена, сахарный диабет II типа, врожденный иммунитет, адаптивный иммунитет.

Introduction

In previous studies, we identified the features of the immune response during opisthorchiasis invasion. Among the indicators of nonspecific resistance are: an increase in the concentration in the blood serum of total circulating complexes; increased activity of the enzyme myeloperoxidase (MP) of neutrophils; increased activity of bactericidal systems

of neutrophils in a spontaneous test with nitroblue tetrazolium (NBT), increased relative and absolute number of eosinophils. In patients with chronic opisthorchiasis (CO), the relative and absolute number of lymphocytes and cytotoxic (CD3⁺CD8⁺) lymphocytes, B-lymphocytes (CD3⁺CD19⁺) and DN-T-lymphocytes decreases; the relative number of T helper cells (CD3⁺CD4⁺) (and, accordingly, the CD4⁺/CD8⁺ index), as well as T lymphocytes with a late activation

marker (CD3⁺HLA-DR⁺), increases, and interleukin balance is disrupted [6]. Relationships have been found between indicators of the functioning of the immune and hepatobiliary systems, reflecting the degree of activity of the pathological process and immune reactions caused by invasion [1]. Conducted studies [2, 5] suggested the influence of genetic polymorphisms associated with a predisposition to the development of non-infectious diseases on the response of the immune system and metabolic processes of patients with CO to invasion. In this work, in order to test this assumption, we studied polymorphisms associated with disorders of carbohydrate and lipid metabolism (the development of type II diabetes mellitus (T2DM) and atherogenesis), which, according to the literature, also affect immunopathogenetic processes.

In particular, the expression of the SLC30A8 gene can be suppressed by cytokines such as IL-1 β and IFN γ [18]. The PPARG gene product is an antagonist of nuclear transcription factors that regulate gene expression during the cell's response to external influences, including the immune response, which underlies their anti-inflammatory and potentially anti-atherosclerotic activity [17, 22, 29]. PPARG ligands reduce the expression of proinflammatory cytokines by T lymphocytes, reduce IL-2 production, and reduce inflammation in the intestine by switching from a Th1- to Th2-response. PPARG selectively controls the activity of Th17 cells, stimulates the transformation of effector T cells into regulatory ones, and is expressed in B lymphocytes [28]. Apolipoprotein E (APOE) suppresses inflammatory activation of phagocytes. Expression of APOE reduces the polarization of macrophages towards the pro-inflammatory M1 phenotype, characterized by the production of the cytokines IL-1 β , IL-6, TNF α , and increases their polarization towards the anti-inflammatory M2 phenotype, characterized by the production of the cytokines IL-4, IL-10. Apolipoproteins (including APOB) are acute phase proteins [9]. Paraonoxase-1 (PON1) hydrolyzes oxidized phospholipids of the plasma membrane of macrophages with the formation of lipolactones (modulators of the local inflammatory process and stimulators of reverse cholesterol transport) [4]; weakens phagocytosis and necrotic death of macrophages, suppresses their proinflammatory reactions [14].

The purpose of the study was to identify differences in the immunopathogenesis of CO in the presence and absence of genetic polymorphisms in patients associated with a predisposition to T2DM and lipid metabolic disorders.

Materials and methods

A comprehensive study of immunological parameters was carried out in venous blood samples of 89 patients diagnosed with opisthorchiasis, chronic phase of the disease.

The study was conducted with the voluntary informed consent of the patients. The study was approved by the ethical committee of the Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology of Rospotrebnadzor (protocol No. 2 of 02/01/2023).

Phagocytic activity of neutrophils (PAN) was determined by the ability of cells to absorb latex particles with $d = 10 \mu\text{m}$ (DIAEM LLC, Moscow) — the percentage of neutrophils out of 200 analyzed containing latex particles. The metabolic activity of neutrophils was determined by the cytochemical method of reducing nitroblue tetrazolium to diformazan (NBT test, spontaneous and stimulated with a 10% pyrogenal solution) [10]. The spontaneous NBT test reflected the degree of activation of oxygen-dependent metabolism and the associated production of free radicals, while the stimulated version (in vitro) characterized the functional reserve [10]. The stimulation index is the ratio of the % of positive cells in the stimulated NBT test to the % of positive cells in the spontaneous NBT test (NBTstim./NBTspont.). The level of neutrophil myeloperoxidase was detected by spectrophotometry [13]. The study of lymphocyte phenotype was carried out by flow cytometry of whole peripheral blood using monoclonal antibodies (Beckman Coulter, USA) labeled with FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X) and PC5 (phycoerythrin-cyanin5) on flow cytometer "Cytomics FC-500" (Beckman Coulter, USA). Three-color immunophenotyping panels were used: CD3/CD4/CD45, CD3/CD8/CD45, CD3/CD16⁺56/CD45, CD3/HLA-DR/CD45 and CD3/CD19/CD45. Main lymphocyte phenotypes: T lymphocytes (CD3⁺CD19⁻CD16/56⁻CD45⁺), T helper cells (CD3⁺CD4⁺CD45⁺), cytotoxic T lymphocytes (CD3⁺CD8⁺CD45⁺), NK cells (CD3⁻CD16/56⁺CD45⁺), activated T-lymphocytes (CD3⁺HLA-DR⁺CD45⁺), B-lymphocytes (CD3⁻CD19⁺CD45). The number of DN-T cells (CD45⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻) was determined by subtracting the relative number of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes from the relative number of CD3⁺ lymphocytes [11].

Absolute values were obtained using dual-platform technology using the results of hematological analysis. The concentration of immunoglobulins M, G, A, and E (IU/ml) in blood serum was determined by the enzyme immunoassay method using commercial kits "Immunoscreen-G, M, A-ELISA-BEST" and "IgE-total-ELISA-BEST" (Vector-Best, Russia). The concentration of cytokines (IFN γ , IL-4, IL-8, IL-10 (pg/ml)) was determined by enzyme immunoassay using commercial kits "Gamma-interferon-ELISA-BEST", "Interleukin-4-ELISA-BEST", "Interleukin-8-ELISA-BEST", "Interleukin-10-ELISA-BEST" (Vector-Best, Russia).

Isolation of total human DNA from blood samples was carried out using the commercial AmpliPrime DNA-sorbB kit. Genetic polymorphisms were identified by pyrosequencing using the PyroMark24 genetic analysis system and commercial reagent kits

“AmpliCenc Pyroscreen”: “DIABET-2-screen” and “DIABET-2D-screen”, “LIPO-screen-B” and “LIPO-screen-D”, designed to assess genetic predisposition to the development of type II diabetes mellitus by detecting polymorphisms in the loci:

- rs5219 of the KCNJ11 gene (ATP-dependent potassium channel);
- rs1801282 of the PPARG2 gene (receptor gamma transcription factor);
- rs7903146 and rs12255372 of the TCF7L2 gene (transcription factor 7);
- rs7756992 of the CDKAL1 gene (cyclin-dependent kinase);
- rs10811661 of the CDKN2A/2B gene (cyclin-dependent kinase inhibitors);
- rs1111875 of the HHEX gene (transcription factor);
- rs4402960 of the IGF2BP2 gene (growth factor regulator);
- rs13266634 of the SLC30A8 gene (zinc ion transporter),

and also to assess genetic predisposition to hereditary forms of lipid metabolism disorders by detecting polymorphisms in loci:

- rs429358 and rs7412 of the APOE gene (apolipoprotein E);
- rs5742904 and rs754523 of the APOB gene (apolipoprotein B);
- rs11206510 of the PCSK9 gene (serine protease);
- rs2230806 ABCA1 gene (ABCA1 transporter);
- rs2854116, rs2854117 and rs5128 of the APOC3 gene (apolipoprotein C3);
- rs268 and rs328 of the LPL gene (lipoprotein lipase);
- rs854560 and rs662 of the PON1 (paraoxonase-1) gene.

Statistical processing of the results was carried out using the on-line calculator <https://www.stat-skkingdom.com>. For each of the studied indicators and identified polymorphisms, groups with the presence and absence of minor alleles were compared

using tests for independent groups: with a normal distribution confirmed by the Shapiro–Wilk test, the Student’s T-test (T-test) was used, taking into account the assessment of equality of variances using the F-test (indicate the mean and standard error of the mean); otherwise, the nonparametric Mann–Whitney Test (U-test) was used (the median value and IQR were indicated — the interquartile range between the 1st and 3rd quartiles). “n” means number of patients in the group. A significance level of $p < 0.05$ was taken as statistically significant differences.

Results

The identified significant differences in the studied parameters between the groups of CO patients with and without minor alleles for individual polymorphisms are shown in Table.

For the rs5742904 polymorphism of the APOB (apolipoprotein B) gene, no mutant alleles were found among the examined patients; for the rs754523 polymorphism, on the contrary, they were detected in all patients except one. This does not make it possible to compare the values of immunological parameters in groups with and without mutations, but suggests that these mutations can affect the body’s vulnerability to infection by the opisthorchiasis pathogen.

In patients with the rare T allele of the rs5219 polymorphism of the KCNJ11 gene, a significantly lower percentage of cytotoxic T lymphocytes ($CD3^+CD8^+$) was detected than in homozygotes for the normal allele.

In the group with the rare G allele for the rs1801282 polymorphism of the PPARG gene, the level of immunoglobulin A was significantly lower.

In the group with the rare T allele for the rs12255372 polymorphism of the TCF7L2 gene, a lower relative number of B-lymphocytes ($CD3^-CD19^+$) and a higher relative number of T-lymphocytes ($CD3^+$) were detected compared to the group of patients without the mutation

Table. Immunological parameters in patients with chronic opisthorchiasis with different genotypes for polymorphisms associated with predisposition to carbohydrate and lipid metabolism disorders (mean±standard error of the mean or median (IQR), n — quantity in group)

Polymorphism indicator, unit of measurement	Without mutation genotype	With mutation genotype	Comparison of groups without and with mutation, p
KCNJ11 rs5219 C > T	CC (n = 15)	TC and TT (n = 25)	
CD3⁺CD8⁺, %	33 (24.5–38.5)	22 (19–29)	0.020 U-Test
PPARG rs1801282 C > G	CC (n = 34)	GC and GG (n = 7)	
IgA, mg/ml	2.4 (1.48–3.09)	1.5 (1.23–1.66)	0.019 U-Test
TCF7L2 rs 12255372 G > T	GG (n = 30)	TG and TT (n = 15)	
CD3⁻CD19⁺, %	11.17±0.80	8.33±1.01	0.040 T-test
CD3⁺, %	75±1.25	80.8±1.18	0.008 T-test
CDKAL1 rs7756992 A > G	AA (n = 29)	AG and GG (n = 36)	
Monocytes, cells/μl	276 (192–354)	205.5 (137.2–277.5)	0.047 U-Test

Group	Without mutation genotype	With mutation genotype	Comparison of groups without and with mutation, p
Polymorphism indicator, unit of measurement			
CD3⁺CD19⁺, cells/μl	185.6 (141.6–241.9)	140.1 (122.2–195.6)	0.045 U-Test
CDKN2A/2B rs10811661 T > C	TT (n = 48)	TC and CC (n = 16)	
IgG, mg/ml	17.55 (11.38–21.26)	11.25 (8.94–14.41)	0.015 U-Test
IGF2BP2 rs4402960 G > T	GG (n = 32)	TG and TT (n = 28)	
FAN, %	83.4 \pm 1.12	79.7 \pm 1.49	0.046 T-test
SLC30A8 rs13266634 C > T	CC (n = 24)	TC and TT (n = 40)	
IgM, mg/ml	1.69 (1.22–2.24)	2.06 (1.69–2.88)	0.042 U-Test
APOE rs429358 T > C	TT (n = 44)	TC and CC (n = 14)	
CD3⁺CD19⁺, cells/μl	158.4 (122.4–231.7)	226.5 (176.3–240.6)	0.033 U-Test
CD3⁺CD19⁺, %	9.56 \pm 0.60	12.14 \pm 1.08	0.038 T-test
Ig E, mg/ml	10.5 (4–27)	40 (19.25–76.75)	0.012 U-Test
DN-T, cells/μl	41 (0–62.3)	57.7 (42.2–103.1)	0.048 U-Test
PCSK9 rs11206510 T > C	TT (n = 18)	TC and CC (n = 3)	
CD3⁺CD8⁺, cells/μl	450.3 (324.5–535.1)	288 (253.4–309.4)	0.035 U-Test
CD4/CD8 ratio	1.90 \pm 0.21	2.78 \pm 0.08	0.001 T-test
CD3⁺CD19⁺, %	9.5 \pm 1.09	16.3 \pm 1.76	0.025 T-test
ABCA1 rs2230806 G > A	GG (n = 38)	AG and AA (n = 18)	
CD3⁺CD8⁺, cells/μl	477.7 (344.8–610.7)	375.9 (289.4–440.6)	0.048 U-Test
CD3⁺HLA-DR⁺, cells/μl	168.3 (113.7–291.7)	109.3 (75.7–180.4)	0.029 U-Test
CD3⁺HLA-DR⁺, %	10 (7–14.5)	8 (6–9)	0.032 U-Test
IL-8, pg/ml	1.15 (0.35–3.38)	3 (1–6)	0.044 U-Test
CD3⁺CD19⁺, %	9.2 \pm 0.66	12 \pm 1.13	0.027 T-test
APOC3 rs2854116 C > T	CC (n = 5)	TC and TT (n = 35)	
Myeloperoxidase, a.u.	923 (856–1708)	608 (366–894.5)	0.022 U-Test
NBT stimulated/NBT spontaneous	3 (2.56–3.3)	2 (1.37–2.62)	0.019 U-Test
CD3⁺HLA-DR⁺, %	11 (11–13)	8 (6–11)	0.034 U-Test
IgA, mg/ml	2.6 \pm 0.26	1.92 \pm 0.12	0.041 T-test
APOC3 rs2854117 C > T	CC (n = 12)	TC and TT (n = 27)	
NBT stimulated/NBT spontaneous	1.8 \pm 0.14	2.39 \pm 0.19	0.017 T-test
CD3⁺CD8⁺, %	21.5 (20.25–22.75)	26 (21–33)	0.039 U-rect
IgA, mg/ml	1.95 \pm 0.29	2.16 \pm 0.13	0.033 T-test
APOC3 rs5128 G > C	GG (n = 10)	GC and CC (n = 47)	
NBT spontaneous, %	13.7 \pm 1.45	20.5 \pm 1.10	0.009 T-test
NBT stimulated/NBT spontaneous	3.2 (2.5–3.4)	2.1 (1.4–2.75)	0.003 U-rect
CD3⁺CD16/56⁺, %	18 (12–20)	11 (8–15)	0.049 U-rect
DN-T, cells/μl	17.4 (0–42.3)	51.9 (31.8–89.8)	0.040 U-rect
LPL rs268 A > G	AA (n = 47)	AG and GG (n = 9)	
NBT stimulated, %	39.2 \pm 1.32	48.8 \pm 1.52	0.0001 T-test
CD3⁺HLA-DR⁺, cells/μl	125.6 (93.2–186.3)	190.8 (153.9–346.3)	0.025 U-rect
DN-T, %	3 (2–5)	0 (0–2.5)	0.042 U-rect
DN-T, cells/μl	52.5 (33.1–78.2)	0 (0–38.2)	0.004 U-rect
LPL rs328 C > G	CC (n = 31)	CG and GG (n = 26)	
NBT spontaneous, %	19 (15.5–27.5)	16.5 (11.25–21)	0.045 U-rect
NBT stimulated/NBT spontaneous	2 (1.37–2.56)	2.64 (2.16–3.08)	0.005 U-rect
PON1 rs854560 A > T	AA (n = 22)	AT and TT (n = 36)	
FAN, %	78.7 \pm 1.77	83.0 \pm 1.19	0.041 T-test
NBT spontaneous, %	19.4 (13.1–24.1)	12.7 (10.6–21)	0.048 U-rect
PON1 rs662 A > G	AA (n = 28)	AG and GG (n = 30)	
CD3⁺CD4⁺, cells/μl	764.6 (612.5–879.8)	856.7 (763.4–1053.9)	0.044 U-rect

In the group with the CDKAL1 gene mutation (rs7756992), lower absolute numbers of monocytes and B-lymphocytes (CD3⁻CD19⁺) were found.

In the presence of a mutation in the CDKN2A/2B gene, lower production of total immunoglobulin G is observed.

The presence of a mutation in the IGF2BP2 gene leads to less phagocytic activity of neutrophils in patients with opisthorchiasis.

In patients with the SLC30A8 gene mutation, a higher concentration of total immunoglobulin M was detected than in the group with the normal allele.

If the genotype contains a rare allele for the first polymorphism rs429358 T > C of the apolipoprotein E gene, the relative and absolute numbers of B-lymphocytes (CD3⁻CD19⁺), the concentration of total immunoglobulin E and the absolute number of DN-T-lymphocytes are significantly higher.

In patients who are carriers of the minor allele of the serine protease gene (PCSK9 rs11206510), a higher relative number of B-lymphocytes and an even greater decrease in the absolute number of cytotoxic T-lymphocytes were found than in patients with CO without this mutation, while the CD4/CD8 index is naturally higher.

When patients with opisthorchiasis have a minor T allele in the ABCA1 transporter gene (ABCA1 rs2230806), a lower absolute number of cytotoxic lymphocytes, an absolute and relative number of T lymphocytes with a marker of late activation (CD3⁺HLA-DR⁺), and a higher relative number of B lymphocytes, as well as IL-8 levels.

The presence of a minor allele in the APOC3 gene (rs2854116) leads to significantly lower values of neutrophil myeloperoxidase enzyme activity, stimulation index in the NBT test, relative number of activated T lymphocytes, and total immunoglobulin A during invasion. Patients with another APOC3 mutation (rs2854117) have a significantly higher neutrophil stimulation index in the NBT test, as well as the number of cytotoxic T-lymphocytes and immunoglobulin A concentration. In patients with the APOC3 rs5128 mutation, the spontaneous NBT test index is higher, and the stimulation index in the NBT-test below; the relative content of natural killer cells (CD3⁺CD16/56⁺) is lower, the absolute number of DN-T lymphocytes is higher.

In patients who are carriers of the G allele in the lipoprotein lipase gene LPL (rs268), the bactericidal activity of neutrophils in the stimulated version of the test with nitroblue tetrazolium is significantly higher, as well as the absolute number of T-lymphocytes with a marker of late activation, and the absolute and relative number of DN-T-lymphocytes is lower. In the presence of a mutation in another polymorphism of the same gene (rs328), the bactericidal activity of neutrophils in the spontaneous version of the NBT test is lower than in patients without this mutation, but the stimulation index is higher.

When the function of the PON1 gene is impaired due to the presence of the minor allele rs854560 in patients with opisthorchiasis, an increase in the absorption activity of neutrophils is observed, but at the same time the rate of the stimulated NBT test decreases. The presence of a minor allele in another locus of this gene (rs662) leads to a significant increase in the absolute number of CD3⁺CD4⁺.

Discussion

When studying immunological parameters, it was found that significant deviations of their values in groups of patients with opisthorchiasis with the presence of rare alleles for various genes associated with the risk of diabetes mellitus and lipid metabolism disorders from the values in groups without mutations can both bring the indicators closer to normal values and aggravate changes caused by invasion in comparison with a group of healthy individuals.

The lower percentage of cytotoxic T lymphocytes in patients with the KCNJ11 rs5219 mutation may be due to the fact that with defects in the ATP-dependent potassium channel, opisthorchiasis invasion is characterized by a more significant decrease in the activity of the effector cell component of immunity.

In the presence of a mutation in the rs1801282 polymorphism of the PPARG gene, which enhances the negative effect of chronic opisthorchiasis invasion on the activity of alpha-amylase and bile secretion parameters [2], a lower level of immunoglobulin A was detected, that is, the humoral link of adaptive immunity in CO reacts with an even greater decrease in its activity. This may be due to the expression of PPARG in B lymphocytes and the effect on lymphocyte proliferation, as well as their antigen-specific response during inflammation [28].

A lower relative number of B-lymphocytes and a higher relative number of T-lymphocytes in the group with the rare T allele for the rs12255372 polymorphism of the TCF7L2 gene (this mutation is associated with both T2DM and obesity and markers of inflammation [7]) indicates an even more pronounced activation cellular immunity and decreased humoral immunity. The TCF7L2 gene product is a component of the Wnt-dependent signaling pathway, the abnormal activation of which is associated with tumor development in colorectal carcinoma [23].

Lower absolute numbers of monocytes and B-lymphocytes in the group with the CDKAL1 gene mutation (rs7756992) may be due to the fact that the mutation aggravates the immune system's response to invasion and has an unfavorable effect: a decrease in the number of monocytes can lead to immunological deficiency, because one of the most important functions of cells of the monocyte-macrophage link — antigen presentation. A smaller number of B-lymphocytes under conditions of high antigenic load in opisthorchiasis may be caused by

enhanced transformation into plasma cells or a decrease in proliferative potential under the influence of mutation. CDKAL1 expression in immune cells, especially CD4⁺ and CD19⁺ lymphocytes, has been shown to be downregulated when they are activated by proliferation signals [26].

In the presence of a CDKN2A/2B gene mutation, the response of the humoral immune system to invasion is probably less pronounced, since a lower concentration of total immunoglobulin G is detected.

Since neutrophils constitute the first line of defense against the penetration of infectious agents and are responsible for the elimination of damaged cells [8], their lower absorption activity in the presence of a mutation in the IGF2BP2 gene in patients with opisthorchiasis is unfavorable, but the absolute value of the differences is small (4.4%), it can be assumed that it does not make a significant contribution to the change in nonspecific resistance in patients with the mutation.

A higher concentration of total immunoglobulin M in patients with the SLC30A8 gene mutation may indicate some impairment in B-lymphocyte differentiation [12].

So, in the presence of the mutations we studied that alter the regulation of carbohydrate metabolism, patients with opisthorchiasis revealed various changes in the immune system (less pronounced increase in phagocytic activity, lower number of monocytes, higher total number of T-lymphocytes, lower number of T-cytotoxic cells and B-lymphocytes, a lower concentration of IgA, IgG and a higher concentration of IgM), which indicate a moderate lack of nonspecific resistance, an imbalance of the effector T- and B-links of immunity, but in most cases (PPARG, TCF7L2 rs12255372, CDKAL1, CDKN2A/2B, SLC30A8) aggravate reaction of humoral immunity to invasion, in particular, a decrease in the number of B-lymphocytes.

If the genotype contains a rare allele for the first polymorphism rs429358 of the APOE gene, there appears to be a positive change in the adaptive humoral immune response to invasion (a higher number of B-lymphocytes and the concentration of total immunoglobulin E). A larger number of DN-T lymphocytes can also be considered a protective change, since this is a minor subpopulation of highly effective suppressor cells and regulators of the intensity of the immune response, which suppress proliferation, change the metabolism, characteristics, effector functions of CD4-T-lymphocytes and shift the CD4-T-lymphocyte phenotype. Lymphocytes towards the resting one, thereby inducing peripheral tolerance [16], which is important for preventing autoimmune complications (probably including opisthorchiasis). There is also evidence in the literature [25] that APOE can suppress cellular immunity by exerting an antiproliferative effect on mitogen-stimulated lymphocytes.

In patients who are carriers of a minor allele of the serine protease gene (PCSK9 rs11206510), which is involved in the regulation of immune system functions [27], disturbances in the subpopulation composition of T-lymphocytes characteristic of CO are aggravated, and the humoral component of immunity apparently tends to restore.

In the presence of a mutation in the ABCA1 transporter gene (involved, in particular, in the mechanism of action of tumor necrosis factor on cells [24]), changes in the parameters of the cellular part of the immune system, characteristic of patients with CO, deepen — there are even fewer effector cells of adaptive immunity, and activated T-lymphocytes are reduced to a level lower than in the whole group of patients with CO, which is not justified under conditions of sufficient antigenic load. The humoral component of the adaptive immune response (relative number of B lymphocytes) and nonspecific resistance (IL-8 level) are activated.

Mutations in different loci of the APOC3 gene (the level of expression of which depends on cytotoxic T cells and varies significantly in tumor tissues [30]) have different effects on immunogram parameters in patients with CO. The differences identified in patients with the APOC3 rs2854116 mutation may indicate that their innate immune response is less pronounced, the potential of neutrophils is depleted, and the reactions of the cellular and humoral components of the adaptive immune response are reduced. In patients with the APOC3 rs2854117 mutation, the bactericidal potential of neutrophils is higher than in patients without the mutation (and than in the general group of patients with CO), changes in the number of cytotoxic T-lymphocytes and the concentration of immunoglobulin A are characteristic of the activation of cellular and humoral immunity, apparently this demonstrates the protective effect of this mutation on immune response parameters. In patients with the APOC3 rs5128 mutation, NBT test indicators indicate activation of the bactericidal ability of neutrophils, and a low number of natural killer cells, on the contrary, indicates a decrease in innate resistance. A higher number of DN-T lymphocytes (leading to the development of tolerance [16]) can also be considered a protective change to prevent autoimmune complications of opisthorchiasis, as with the APOE rs429358 mutation.

In patients with the LPL rs268 mutation, NBT test indicators indicate stimulation of nonspecific resistance, and a greater number of T lymphocytes with a late activation marker indicate a greater participation of adaptive cellular immunity. An increased reaction of these components of the immune response may be associated, among other things, with a lower absolute and relative number of DN-T lymphocytes, which can lead to hyperstimulation of the immune response (as well as autoimmune diseases) [16]. In the presence of a mutation in another LPL poly-

morphism (rs328), apparently, with a slightly lower bactericidal activity of neutrophils, their potential bactericidal activity has a certain reserve. This suggests a “protective” effect for the immune response to opisthorchiasis invasion of this “antiatherogenic” minor allele of LPL, associated with favorable changes in lipid composition (lowered triglyceride levels and increased HDL levels [19, 21]), as well as with lipid-associated macrophages [20] and inflammatory processes [15].

In CO patients with the PON1 rs854560 mutation, the bactericidal activity of neutrophils is reduced and an increase in the absorption activity of these cells can be considered as a compensatory mechanism. Perhaps such effects are associated with the involvement of paraoxanase-1 in the functions of innate immunity noted in the literature: it is believed that it protects against bacterial infection by destroying signaling molecules that produce gram-negative bacteria for invasion into human tissues and the formation of colonies [3, 4]. The presence of a minor allele in another PON1 locus (rs662) leads to a higher number of T helper cells, approaching those of the control group of practically healthy people. The immune response in chronic opisthorchiasis is generally characterized by an increase in the relative number of T-helper cells.

Thus, the presence of polymorphisms that disrupt the regulation of lipid metabolism has a multidirectional effect on the parameters of the immune response, possibly shifting the development of the immune response in different directions (T-helper cells type 1 or 2, etc.). At the same time, the approach of indicators of different parts of the immune system to the “normal” level in the presence of chronic parasitic invasion cannot always be interpreted as a positive effect of one or another polymorphism due to possible compensatory shifts in different parts of the immune system. However, an increased number of B-lymphocytes and other indicators of activation of the humoral immune system in response to invasion, which are detected in groups with mutations

in the APOE (rs429358), PCSK9, ABCA1, APOC3 rs2854117 genes, may contribute to a more effective response to constant antigenic stimulation. Changes in the subpopulation composition of T-lymphocytes, characteristic of opisthorchiasis invasion, are aggravated in the presence of mutations in the PCSK9, ABCA1, APOC3 rs2854117 genes. Mutations in the genes APOC3 rs5128, LPL rs268 activate nonspecific resistance of patients with CO, although this effect may also be associated with depletion of the bactericidal reserve of neutrophils. In general, minor alleles of the genes APOE rs429358, APOC3 rs2854117, LPL rs268, LPL rs328, PON1 rs662 can be considered “protective” for the immunopathogenesis of CO.

As a result of the study, significant differences in the indicators of immune system function were identified in patients with chronic opisthorchiasis with different genotypes predisposing to disorders of carbohydrate and lipid metabolism, which may also affect the course of the disease. Mutations in different loci of the PCSK9, ABCA1, APOE, APOC3 and PON1 genes have opposite effects on the studied parameters of various components of the immune response. When mutations cause dysfunction of a number of proteins (PPARG, TCF7L2 rs12255372, CDKAL1, CDKN2A/2B, SLC30A8, LPL), opisthorchiasis invasion leads to more pronounced deviations in the immune response; mutations in the lipoprotein lipase gene may have some kind of “protective” effect on the immune system of patients with opisthorchiasis. At the same time, the effect of all studied genetic polymorphisms associated with a predisposition to the development of T2DM turned out to be predominantly negative.

Acknowledgement

The authors express gratitude for the technical assistance in conducting research to the biologists of the Tyumen Region Infection Pathology Research Institute E.A. Zmatrakova, A.Z. Bartusevich.

References

1. Бакштановская И.В., Степанова К.Б., Кальгина Г.А., Степанова Т.Ф. Взаимосвязи биохимических и иммунологических показателей у больных хроническим описторхозом // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2018. № 2. С. 13–19. [Bakshantovskaya I.V., Stepanova K.B., Kalgina G.A., Stepanova T.F. Relationships between biochemical and immunological parameters in patients with chronic opisthorchiasis. *Meditsinskaia parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2018, no. 2, pp. 13–19. (In Russ.)]
2. Бакштановская И.В., Степанова К.Б., Озерова А.Н., Степанова Т.Ф., Зматракова Е.А. Показатели функций гепатобилиарной системы у больных хроническим описторхозом с генетической предрасположенностью к развитию сахарного диабета 2 типа // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2023. № 1. С. 3–9. [Bakshantovskaya I.V., Stepanova K.B., Ozerova A.N., Stepanova T.F., Zmatrakova E.A. Indicators of the functions of the hepatobiliary system in patients with chronic opisthorchiasis with a genetic predisposition to the development of type 2 diabetes mellitus. *Meditsinskaia parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2023, no. 1, pp. 3–9. (In Russ.)] doi: 10.33092/0025-8326mp2023.1.3-9
3. Боровкова Е.И., Антипова Н.В., Корнеев Т.В., Шахпаронов М.И., Боровков И.М. Параоксоназа: универсальный фактор антиоксидантной защиты организма человека // Вестник Российской академии медицинских наук. 2017. Т. 72, № 1. С. 5–10. [Borovkova E.I., Antipova N.V., Korneev T.V., Shakhparonov M.I., Borovkov I.M. Paraoxonase: a universal factor in the antioxidant defense of the human body. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2017, vol. 72, no. 1, pp. 5–10. (In Russ.)] doi: 10.15690/vramn764

4. Войтович А.Н., Богданова М.А., Смирнов Б.И., Бадмаева М.И., Пардо-Пералес Г.Д., Бойцов С.А., Кириллова Н.В., Беркович О.А., Шляхто Е.В., Ларионова В.И. Нарушения липидного обмена, активность параоксоназы 1 и полиморфизм L55M и Q192R в гене параоксоназы 1 у больных ишемической болезнью сердца // Артериальная гипертензия. 2010. Т. 16, № 6. С. 569–575. [Voitovich A.N., Bogdanova M.A., Smirnov B.I., Badmaeva M.I., Pardo-Perales G.D., Boitsov S.A., Kirillova N.V., Berkovich O.A., Shlyakhto E.V., Larionova V.I. Lipid metabolism disorders, paraoxonase 1 activity and L55M and Q192R polymorphism in the paraoxonase 1 gene in patients with coronary heart disease. *Arterial'naya gipertenziya = Arterial Hypertension*, 2010, vol. 16, no. 6, pp. 569–575. (In Russ.)]
5. Григорьева С.А., Косырева А.Н., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б., Бакштановская И.В., Кальгина Г.А., Курлаева Л.В. Показатели иммунной системы у пациентов с хроническим описторхозом в зависимости от полиморфизмов генов, ассоциированных с развитием ишемической болезни сердца // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 177–183. [Grigorieva S.A., Kosyreva A.N., Stepanova T.F., Stepanova K.B., Bakshtanovskaya I.V., Kalgina G.A., Kurlaeva L.V. Immune system parameters in chronic opisthorchiasis patients related to genes polymorphisms associated with developing ischemic heart disease. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 177–183. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ISI-1334
6. Григорьева С.А., Степанова К.Б., Степанова Т.Ф., Кальгина Г.А., Курлаева Л.В. Различия иммунного реагирования у пациентов с хронической описторхозной инвазией в зависимости от наличия клинических проявлений заболеваний органов гепатобилиарной системы // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 363–368. [Grigorieva S.A., Stepanova K.B., Stepanova T.F., Kalgina G.A., Kurlaeva L.V. Differences in immune response in patients with chronic opisthorchiasis invasion related to clinical manifestations of hepatobiliary system diseases. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 363–368. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-DII-2099
7. Железнякова А.В., Лебедева Н.О., Викулова О.К., Носиков В.В., Шамхалова М.Ш., Шестакова М.В. Риск развития хронической болезни почек у больных сахарным диабетом 2 типа детерминирован полиморфизмом генов NOS3, APOB, KCNJ11, TCF7L2 // Сахарный диабет. 2014. Т. 17, № 3. С. 23–30. [Zheleznyakova A.V., Lebedeva N.O., Vikulova O.K., Nosikov V.V., Shamhalova M.Sh., Shestakova M.V. The risk of developing chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes mellitus is determined by polymorphisms in the NOS3, APOB, KCNJ11, TCF7L2 genes. *Sakharnyi diabet = Diabetes Mellitus*, 2014, vol. 17, no. 3, pp. 23–30. (In Russ.)] doi: 10.14341/DM2014323-30
8. Кузнецова Е.И., Чепелева М.В., Камшилов Б.В. Влияние эндопротезирования на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови // Гений ортопедии. 2011. № 1. С. 91–93. [Kuznetsova E.I., Chepeleva M.V., Kamshilov B.V. Influence of arthroplasty on the phagocytic activity of peripheral blood neutrophils. *Genii ortopedii = Genius of Orthopedics*, 2011, no. 1, pp. 91–93. (In Russ.)]
9. Малашенкова И.К., Крынский С.А., Мамошина М.В., Дидковский Н.А. Полиморфизм гена APOE: влияние аллеля APOE4 на системное воспаление и его роль в патогенезе болезни Альцгеймера // Медицинская иммунология. 2018. Т. 20, № 3. С. 303–312. [Malashenkova I.K., Krynskiy S.A., Mamoshina M.V., Didkovskiy N.A. APOE gene polymorphism: the impact of APOE4 allele on systemic inflammation and its role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, vol. 20, no. 3, pp. 303–312. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-303-312
10. Меньшиков И.В., Бедулева Л.В. Основы иммунологии: лабораторный практикум. Ижевск: Удмуртский университет, 2001. 133 с. [Menshikov I.V., Beduleva L.V. Fundamentals of immunology: laboratory practice. *Izhevsk: Udmurt University*, 2001. 133 p. (In Russ.)]
11. Мирошниченко И.В., Столпникова В.Н., Левашова Т.В., Сорокина Е.А. γδТ-лимфоциты у пациентов старших возрастных групп // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2011. № 22 (117). С. 78–82. [Miroshnichenko I.V., Stolpnikova V.N., Levashova T.V., Sorokina E.A. γδT lymphocytes in patients of older age groups. *Nauchnye ведомosti Belgorodskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya = Scientific Bulletins of Belgorod State University. Series: Medicine, Pharmacy*, 2011, no. 22 (117), pp. 78–82. (In Russ.)]
12. Хайтов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология: Учебник. М.: Медицина, 2000. 432 с. [Khaitov R.M., Ignatieva G.A., Sidorovich I.G. Immunology: Textbook. *Moscow: Medicine*, 2000. 432 p. (In Russ.)]
13. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Методические рекомендации по оценке иммунного статуса человека. В кн.: Экологическая иммунология. М.: Изд-во ВНИРО, 1995. С. 126–127. [Khaitov R.M., Pinegin B.V., Istamov H.I. Methodical recommendations for evaluation of human immune status. In: *Ecological Immunology. Moscow: Publishing house VNIRO*, 1995. P. 126–127. (In Russ.)]
14. Aharoni S., Aviram M., Fuhrman V. Paraoxonase 1 (PON1) reduces macrophage inflammatory responses. *Atherosclerosis*, 2013, vol. 228, no. 2, pp. 353–361. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.005
15. Chang C.L. Lipoprotein lipase: new roles for an “old” enzyme. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2019, vol. 22, no. 2, pp. 111–115. doi: 10.1097/MCO.0000000000000536
16. Haug T., Aigner M., Peuser M.M., Strobl C.D., Hildner K., Mouggiakakos D., Bruns H., Mackensen A., Vökl S. Human double-negative regulatory T-cells induce a metabolic and functional switch in effector T-cells by suppressing mTOR activity. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 10: 883. doi: 10.3389/fimmu.2019.00883
17. Hirabara S.M., Gorjão R., Vinolo M.A., Rodrigues A.C., Nachbar R.T., Curi R. Molecular targets related to inflammation and insulin resistance and potential interventions. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012, vol. 2012: 379024. doi: 10.1155/2012/379024
18. Huang Q., Du J., Merriman C., Gong Z. Genetic, functional, and immunological study of ZnT8 in diabetes. *Int. J. Endocrinol.*, 2019, vol. 2019: 1524905. doi: 10.1155/2019/1524905
19. Jemaa R., Fumeron F., Poirier O., Lecerf L., Evans A., Arveiler D., Luc G., Cambou J.P., Bard J.M., Fruchart J.C. Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with myocardial infarction and lipoprotein levels, the ECTIM study. Etude Cas Témoin sur l'Infarctus du Myocarde. *J. Lipid. Res.*, 1995, vol. 36, no. 10, pp. 2141–2146
20. Liu Z., Gao Z., Li B., Li J., Ou Y., Yu X., Zhang Z., Liu S., Fu X., Jin H., Wu J., Sun S., Sun S., Wu Q. Lipid-associated macrophages in the tumor-adipose microenvironment facilitate breast cancer progression. *Oncoimmunology*, 2022, vol. 11, no. 1: 2085432. doi: 10.1080/2162402X.2022.2085432

21. Ma W.Q., Wang Y., Han X.Q., Zhu Y., Liu N.F. Associations between LPL gene polymorphisms and coronary artery disease: evidence based on an updated and cumulative meta-analysis. *Biosci Rep.*, 2018, vol. 38, no. 2: BSR20171642. doi: 10.1042/BSR20171642
22. Ohshima K., Mogi M., Horiuchi M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in vascular inflammation. *Int. J. Vasc. Med.*, 2012, vol. 2012: 508416. doi: 10.1155/2012/508416
23. Ou Y., Jing G., Liu J., Gao S., Cheng Z., Dong X. [T cell factor 4, beta-catenin and SFRP1 expression of wnt signaling pathway in colorectal carcinoma and the prognosis]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 2015, vol. 32, no. 4, pp. 854–861. (In Chinese)
24. Pedigo C.E., Ducasa G.M., Leclercq F., Sloan A., Mitrofanova A., Hashmi T., Molina-David J., Ge M., Lassenius M.I., Forsblom C., Lehto M., Groop P.H., Kretzler M., Eddy S., Martini S., Reich H., Wahl P., Ghiggeri G., Faul C., Burke G.W. 3rd, Kretz O., Huber T.B., Mendez A.J., Merscher S., Fornoni A. Local TNF causes NFATc1-dependent cholesterol-mediated podocyte injury. *J. Clin. Invest.*, 2016, vol. 126, no. 9, pp. 3336–3350. doi: 10.1172/JCI85939
25. Pepe M.G., Curtiss L.K. Apolipoprotein E is a biologically active constituent of the normal immunoregulatory lipoprotein, LDL-In. *J. Immunol.*, 1986, vol. 136, no. 10, pp. 3716–3723
26. Quaranta M., Burden A.D., Griffiths C.E., Worthington J., Barker J.N., Trembath R.C., Capon F. Differential contribution of CDKAL1 variants to psoriasis, Crohn's disease and type II diabetes. *Genes Immun.*, 2009, vol. 10, no. 7, pp. 654–658. doi: 10.1038/gene.2009.51
27. Rose M., Duhamel M., Rodet F., Salzet M. The role of proprotein convertases in the regulation of the function of immune cells in the oncoimmune response. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 667850. doi: 10.3389/fimmu.2021.667850
28. Semple R.K., Chatterjee V.K., O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J. Clin. Invest.*, 2006, vol. 116, no. 3, pp. 581–589. doi: 10.1172/JCI28003
29. Takata Y., Liu J., Yin F., Collins A.R., Lyon C.J., Lee C.H., Atkins A.R., Downes M., Barish G.D., Evans R.M., Hsueh W.A., Tangirala R.K. PPARdelta-mediated antiinflammatory mechanisms inhibit angiotensin II-accelerated atherosclerosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2008, vol. 105, no. 11, pp. 4277–4282. doi: 10.1073/pnas.0708647105
30. Wang H., Fu Y., Da B.B., Xiong G.. Single-cell sequencing identifies the heterogeneity of CD8⁺ T cells and novel biomarker genes in hepatocellular carcinoma. *J. Healthc. Eng.*, 2022, vol. 2022: 8256314. doi: 10.1155/2022/8256314

Авторы:

Бакштановская И.В., к.б.н., руководитель группы молекулярно-генетических и паразитологических исследований, ученый секретарь ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Григорьева С.А., научный сотрудник группы клинической и экспериментальной иммунологии 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, заведующий клиникой ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Озерова А.Н., научный сотрудник группы молекулярно-генетических и паразитологических исследований ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Кальгина Г.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель группы клинической и экспериментальной иммунологии ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Курлаева Л.В., младший научный сотрудник группы клинической и экспериментальной иммунологии ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия.

Authors:

Bakshantovskaya I.V., PhD (Biology), Head of the Molecular Genetic and Parasitological Research Group, Scientific Secretary, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Grigorieva S.A., Researcher, Clinical and Experimental Immunology Group, 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, Head of the Clinic, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Ozerova A.N., Researcher, Molecular Genetic and Parasitological Research Group, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Kalgina G.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Head of the Clinical and Experimental Immunology Group, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Kurlaeva L.V., Junior Researcher, Clinical and Experimental Immunology Group, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation.

SAFETY AND EFFECTIVENESS OF SINGLE- VERSUS DOUBLE-DOSE OF SEASONAL INFLUENZA VACCINE IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS: A RANDOMIZED CLINICAL TRIAL

M. Meidani^a, M. Khatami^b, A. Abdollahi^c, P. Mirzapour^d, E. Karimian^e, S. SeyedAlinaghi^d

^a Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^b Nephrology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^c School of Medicine, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^d Iranian Research Center for HIV/AIDS, Iranian Institute for Reduction of High-Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^e School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract. *Introduction.* Influenza virus poses significant risks to immunocompromised individuals such as those who have received organ transplants and are undergoing immunosuppressive treatment to prevent transplant rejection. Therefore, annual influenza vaccination is recommended for these individuals. This study aimed to comparison of safety and effectiveness of single- versus double-dose of seasonal influenza vaccine in kidney transplant recipients. *Materials and methods.* This randomized clinical trial involved 50 kidney transplant recipients at Imam Khomeini Hospital. Participants were randomly assigned to two groups: those receiving a single dose (standard dose) and those receiving a double dose of the seasonal flu vaccine. Serum samples were collected before and 4 weeks after vaccination to measure influenza A&B-related antibodies. Sixteen patients were excluded from the study. The trial focused on evaluating the vaccine safety and immunogenicity, as well as documenting any local and systemic side effects following vaccination. *Results.* The results indicated no significant difference in gender, age, and type of immunosuppressive drug used between the single- and double-dose groups ($p > 0.05$). No significant difference in post-vaccination adverse effects, such as injection site pain ($p = 0.21$) between the two groups. The seroconversion rates (change from IgG < 9 IU/ μ L to IgG > 11 IU/ μ L) for IgG Influenza A were 12.5% ($n = 2$) in the single-dose group and 26.7% ($n = 4$) in the double-dose group, and for IgG Influenza B, they were 11.8% ($n = 2$) and 21.4% ($n = 3$), respectively. *Conclusion.* A double dose of the influenza vaccine slightly enhanced the immune response in kidney transplant patients without causing any adverse side effects.

Key words: influenza vaccine, transplant recipients, double dose, immunogenicity, effectiveness, single dose.

Адрес для переписки:

Сейед Ахмад СейедАлиаги
1419733141, Иран, Тегеран, бульвар Кешаварз,
Иранский исследовательский центр ВИЧ/СПИД,
Иранский институт снижения поведения высокого риска,
Тегеранский университет медицинских наук.
Тел./факс: +98 21 66947984.
E-mail: s_a_alinaghi@yahoo.com

Эльназ Каримян
Школа медицины, Тегеранский университет медицинских наук,
Тегеран, Иран.
Тел.: +98 9123871339. E-mail: karimianelnaz@yahoo.com

Contacts:

Seyed Ahmad SeyedAlinaghi
1419733141, Iran, Tehran, Keshavarz Blvd.,
Iranian Research Center for HIV/AIDS, Iranian Institute for Reduction
of High-Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences.
Phone/fax: +98 21 66947984.
E-mail: s_a_alinaghi@yahoo.com
Elnaz Karimian
School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences,
Tehran, Iran.
Phone: +98 9123871339. E-mail: karimianelnaz@yahoo.com

Для цитирования:

Мейдани М., Хатами М., Абдоллахи А., Мирзапур П., Каримян Э., СейедАлиаги С. Безопасность и эффективность однодозовой и двухдозовой вакцины от сезонного гриппа у реципиентов трансплантации почки: рандомизированное клиническое исследование // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 125–132. doi: 10.15789/2220-7619-SAE-17550

Citation:

Meidani M., Khatami M., Abdollahi A., Mirzapour P., Karimian E., SeyedAlinaghi S. Safety and effectiveness of single- versus double-dose of seasonal influenza vaccine in kidney transplant recipients: a randomized clinical trial // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 125–132. doi: 10.15789/2220-7619-SAE-17550

БЕЗОПАСНОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОДНОДОЗОВОЙ И ДВУДОЗОВОЙ ВАКЦИНЫ ОТ СЕЗОННОГО ГРИППА У РЕЦИПИЕНТОВ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ: РАНДОМИЗИРОВАННОЕ КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Мейдани М.¹, Хатами М.², Абдоллахи А.³, Мирзапур П.⁴, Каримян Э.⁵, СейедАлиаги С.⁴

¹ Больница Имама Хомейни, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

² Научно-исследовательский центр нефрологии, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

³ Медицинский факультет, Больница Имама Хомейни, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

⁴ Иранский исследовательский центр ВИЧ/СПИД, Иранский институт снижения поведения высокого риска, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

⁵ Школа медицины, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

Резюме. *Введение.* Вирус гриппа представляет значительный риск для лиц с ослабленным иммунитетом, например, для реципиентов трансплантации органов и получающих иммуносупрессивное лечение для предотвращения отторжения трансплантата. Поэтому таким лицам рекомендуется проведение ежегодной вакцинации против гриппа. Целью настоящего исследования было сравнение безопасности и эффективности однократной и двудозовой вакцины против сезонного гриппа у реципиентов трансплантата почки.

Материалы и методы. В рандомизированном клиническом исследовании приняли участие 50 реципиентов почечного трансплантата в больнице Имама Хомейни, которые случайным образом были разделены на две группы: получившие однократную дозу (стандартную дозу) и получившие двойную дозу вакцины против сезонного гриппа. Образцы сыворотки собирали до после вакцинации и через 4 недели после нее для измерения антител против антигенов вакцинных вирусов гриппа А и В. Шестнадцать пациентов были исключены из исследования. Исследование было сосредоточено на оценке безопасности и иммуногенности вакцины, а также на документировании любых местных и системных побочных эффектов после вакцинации. *Результаты.* В ходе исследования не были отмечены существенные различия по полу, возрасту и типу иммунодепрессанта, используемого между группами, получавшими однократную и двойную дозу ($p > 0,05$). Между двумя группами не обнаружено существенных различий в побочных эффектах после вакцинации, таких как боль в месте инъекции ($p = 0,21$). Частота сероконверсии (изменение от $\text{IgG} < 9 \text{ ME/мкл}$ до $\text{IgG} > 11 \text{ ME/мкл}$) для IgG против гриппа А составила 12,5% ($n = 2$) в группе однократного приема и 26,7% ($n = 4$) в группе двудозовой вакцинации, а для IgG против гриппа В они составили 11,8% ($n = 2$) и 21,4% ($n = 3$) соответственно. *Заключение.* Двойная доза противогриппозной вакцины незначительно усиливала иммунный ответ у реципиентов трансплантата почки, без развития каких-либо побочных эффектов.

Ключевые слова: вакцина против гриппа, реципиенты трансплантата, двойная доза, иммуногенность, эффективность, однократная доза.

Introduction

The influenza virus is the main cause of seasonal influenza, which is generally associated with symptoms such as fever, myalgia and respiratory symptoms. In healthy people, this disease can improve without any medication [1]. Influenza is still considered as an infectious disease with high prevalence in the society. According to the statistics announced by World Health Organization (WHO), this virus infects between 5–10% of adults and 20–30% of children annually [2]. In America, it is estimated that this virus causes 36 000 deaths annually and leads to approximately 200 000 hospitalizations [1].

Most experts concur that influenza virus particles are transmitted through coughing, sneezing, and talking, potentially infecting those in close proximity to an infected individual. In some cases, the influenza infection in children and people with compromised immune systems might experience prolonged

influenza infections, necessitating an extended duration of monitoring for pathogenicity [3]. Chronic medical conditions, such as heart disease, lung disease, diabetes, renal disease, rheumatologic disease, dementia, and stroke are identified as risk factors for influenza. Regardless of age, having underlying diseases can increase the chances of hospitalization and death upon contracting influenza [4, 5].

In a study of 616 transplant recipients (477 organs and 139 bone marrow), suffering from influenza, the most reported clinical symptoms were cough in 85% and fever in 64%, and pneumonia in 22.1% of patients. Eleven percent required intensive care unit (ICU) admission, with some also reporting headache, body pain, gastrointestinal symptoms, myocarditis, and myositis [6]. In another study conducted in Europe, invasive *Aspergillus* was detected in 83 cases out of 432 cases of severe influenza that were hospitalized for an average of 3 days in ICU. Notably, organ transplantation is recognized as

a common risk factor for invasive *Aspergillus* infection [7, 8, 9]. Another study in the USA showed that out of 237 transplant patients with influenza, approximately 70% were hospitalized, 16% required ICU care, and 4% succumbed to respiratory failure [6, 7, 8, 10]. Another U.S. study on adult hematopoietic cell transplant recipients found that systemic reactions were comparable between groups following both injections during the study [11].

Some clinical studies emphasize the beneficial effects of the flu vaccine in people who have undergone transplants. Seasonal flu vaccines are widely recognized as the most important strategy in combating influenza virus. Consequently, it is strongly recommended that organ transplant recipients receive an annual the influenza vaccination [3, 10]. However, given the significance of care and treatment for kidney transplant patients and existing research in this domain, further comprehensive studies are warranted. So, due to the lack of research in the field of evaluates the effectiveness of two different influenza vaccination and more emphasis on the kidney transplant recipients, we consider it necessary to conduct more studies in this field. Therefore, in the present study, we evaluated and compared the safety and effectiveness of single- (standard) versus double-dose of seasonal influenza vaccine in kidney transplant recipients.

Materials and methods

Study setting. This study was a randomized, open-label clinical trial involving 50 kidney transplant recipients at Imam Khomeini Hospital in Tehran in 2019. We included all the individuals who had undergone a kidney transplant and visited Imam Khomeini Hospital to receive their annual influenza vaccine. After administering the vaccine, the immune response and possible side effects of the vaccine in were measured and monitored.

Participants selection. Eligible participants were kidney transplant recipients, aged at least 18 years old, who regularly attended the transplant outpatient clinic of Imam Khomeini Hospital for follow-up visits. In order to be eligible to receive the vaccine, at least 3 months should have passed from their transplant. Providing informed consent was necessary to participate in the study. Exclusion criteria were as follows:

1. Undergoing treatment for acute transplant rejection;
2. Experiencing any febrile illness within the two weeks before the vaccine administration;
3. A history of threatening reactions to previous vaccines (such as Guillain-Barré syndrome);
4. Presence of an active autoimmune disease;
5. Those transplanted less than 3 months prior.

Study design. At the beginning of the study, the participants were randomly divided into two

groups: one received a single dose (standard does) and other a double dose of FLUVAC 2020/2021 quadrivalent influenza vaccine at 1:1 ratio. Patients in the single-dose group received one intramuscular injection (15 µg of HA antigen for each strain) in the deltoid muscle of the non-dominant arm, while patients in the double-dose group received two simultaneous intramuscular injections, one in each deltoid muscle (30 µg of antigen for each strain), sourced from the similar influenza vaccine.

Data collection. The serum samples were collected before and 4 weeks after vaccination, then stored at minus 70 degrees Celsius for further influenza antibody measurement. The immune response was assessed using the Spanish Vircell brand IgM/IgG antibody assay kit with 95% sensitivity and 89% specificity. IgM/IgG antibody levels below 9 against influenza A&B were considered negative. Furthermore, IgM antibody level was measure to rule out acute influenza infection.

According to previous studies on the side effects of influenza vaccine, patients were asked to report local side effects (pain, redness and swelling) and systemic side effects (fever, headache, tiredness, nausea or vomiting, muscle and joint pain) within the first 3 days' post-vaccination. Patients were followed up for the occurrence of vaccination complications 3 days after receiving the vaccine. Systemic side effects were recorded as none, mild (no interference with normal daily activities), moderate (some interference with normal daily activities) or severe (patient unable to perform normal daily activities). Pain at the injection site was assessed as none, mild (pain on touch), moderate (pain when moving the limb) or severe (spontaneous pain). Redness and swelling at the injection site were assessed as none, mild (more than 5 mm), moderate (more than 20 mm) or severe (more than 50 mm) according to the measured diameter. Fever was defined as a body temperature more than 38 degrees Celsius. In case of flu-like symptoms, patients were advised to visit the outpatient clinic [12, 13].

Four weeks after vaccination, the immune response was assessed by comparing post-vaccination serum antibody levels with those before vaccination. Based on the used kit, seroprotection was defined as IgG antibody titer less than 11 IU/µL. In addition, seroconversion was measured by GMT (mean antibody titer after vaccination) and IgG production. Based on the used kit, converting values were assigned as > 9 IU/µL and > 11 IU/µL against influenza type A and B.

Ethical considerations. This research has been approved by Tehran University of Medical Sciences with ethical code (IR.TUMS.IKHC.REC.1399.333). In addition, in all stages of the research, justification and obtaining permission from all patients was done by filling out a written consent form, and no financial costs were imposed on the patients and all subjects

for the research. The collection of information from the files was done without mentioning the names of the patients and completely confidentially.

Statistical analysis. Quantitative variables were presented using mean and standard deviation, while categorical variables were described with percentages and frequencies. T-test or Mann–Whitney, and Chi-square (χ^2) test were used to compare the immune response between two groups. All analyzes were done with SPSS software version 26. A significance level of less than 0.05 was considered significant.

Results

In this study, participants were divided into two groups; one receiving single dose (standard dose) and the other receiving a double dose of seasonal influenza vaccine. Serum samples from 50 patients were collected prior to vaccination. Four weeks post-vaccination, 34 patients (17 patients in the single-dose group and 17 patients in the double-dose group) were attended the follow up visit and samples were collected for the measurement of IgG&IgM antibodies

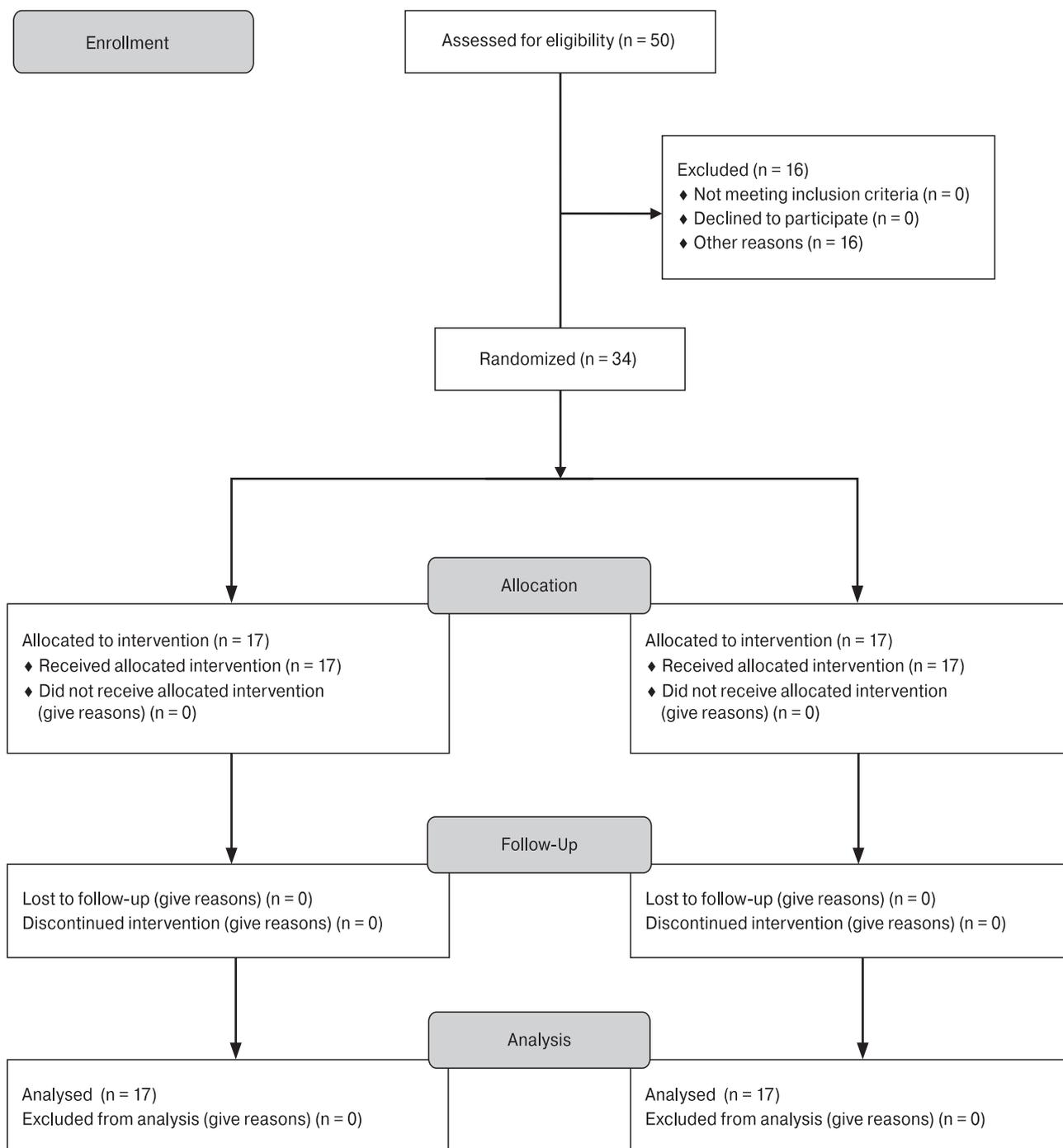


Figure. CONSORT 2010 Flow Diagram

Table 1. Demographic and clinical information of the studied patients

Variable		Recipient of two doses of vaccine, n (%)	Recipient of a vaccine dose, n (%)	P-value
Age, mean (SD)		45.4 (10.59%)	44.76 (14.74%)	0.86
Gender	Male (n, %)	10 (40%)	13 (52%)	0.40
	Female (n, %)	15 (60%)	12 (48%)	
History of receiving vaccines (n, %)		16 (64%)	20 (80%)	0.21
Injection site pain (n, %)		4 (16%)	4 (16%)	> 0.9
Prograf drug use (n, %)		19 (76%)	19 (76%)	> 0.9
Myfortic drug consumption (n, %)		21 (84%)	20 (80%)	> 0.9
Prednisolone drug use (n, %)		25 (100%)	25 (100%)	> 0.9
Cyclosporine drug use (n, %)		1 (4%)	1 (4%)	> 0.9
Time since transplantation, mean (SD) (months)		55.64 (54.51%)	49.33 (34.52%)	0.63

against influenza A&B. Patients, on average, were undergoing immunosuppressive treatment, with daily doses ranging from 2.5–5 mg of Prednisolone, 75 mg of Cyclosporine, 1 mg of Prograf, and 1 gram of Myfortic. These doses were determined by their respective attending physicians. Additionally, any local and systemic side effects were recorded in follow up visit post-vaccination. More details about the randomization process are provided by the CONSORT 2010 Flow Diagram (Fig.).

Table 1 presents the demographic and clinical information of the patients in two groups. The average age for patients receiving a single dose was 44.14 ± 76.74 years and for patients receiving two doses of vaccine was 45.10 ± 4.59 years. There was no statistically significant difference between the average age in the two groups ($p = 0.86$). In the single-dose group, 52% ($n = 13$) were men, compared to 40% ($n = 10$) in the double-dose group. The difference in gender distribution between the groups was not statistically significant ($p = 0.4$). In the group receiving one dose of vaccine, 20 people (80%) and in the group receiving two doses of vaccine 16 people (64%) had a history of receiving vaccine. There was no significant difference between these two groups in terms of history of receiving vaccines ($p = 0.21$). The injection site pain was not significantly different in both groups ($p = 0.9$). No statistically significant difference was observed regarding the use of Prograf, Myfortic, Prednisolone and Cyclosporine drugs ($p = 0.9$). The time since transplantation in the group receiving one dose of vaccine was 49.34 ± 33.52 months and in the group receiving two doses of vaccine was 55.54 ± 64.51 months, and there was no significant difference between the two groups in terms of the time since transplantation ($p = 0.63$).

It shows the rate of seroconversion and the cases where the average IgG antibody titer < 9 IU/ μ L af-

ter 4 weeks changed to the average IgG antibody titer > 11 IU/ μ L in the two studied groups. It is worth mentioning the cases where the average antibody titer $9 < \text{IgG} < 11$ IU/ μ L was based on the kit used, it was considered unclear and due to the need to repeat the test and the lack of patient referrals for re-examination, it was not considered in the results. The average titer of IgGA antibody was less than 9 IU/ μ L before injection in the single-dose and two-dose groups, respectively, 72% ($n = 18$) and 72.7% ($n = 16$). The amount of seroconversion IgGA average antibody titer changed by 12.5% ($n = 2$) and 26.7% ($n = 4$) respectively after injection in single dose and two dose groups. The average titer of IgGB antibody values less than 9 IU/ μ L before injection in the single dose and two dose groups were 81% ($n = 17$) and 76% ($n = 19$), respectively. The rate of seroconversion of IgGB after injection in the single-dose and two-dose groups was 11.8% ($n = 2$) and 21.4% ($n = 3$), respectively. In terms of systemic side effects, no complications were observed after the injection of the vaccine. For local side effects, pain at the injection site was reported in four patients post-vaccination which was resolved after 48 hours. No significant difference in side effects were observed between the two groups (Table 2).

Discussion

In this clinical trial study, we evaluated and measured the immunogenicity and safety of one dose (15 μ g) versus two doses (30 μ g) of the influenza vaccine in kidney transplant patients. Overall, the vaccine response across the entire study population was suboptimal. Nevertheless, a heightened response rate and a trend towards increased immunogenicity were noted in participants receiving two doses compared to those given a single dose (Table 2).

Table 2. Seroconversion rate in the two studied groups, %

Variable	Single dose n (%)	Double dose n (%)
IgGA (IU/μL)		
Before injection (IgG < 9)	18 (72%)	16 (72.7%)
After injection (IgG > 11)	2 (12.5%)	4 (26.7%)
IgGB (IU/μL)		
Before injection (IgG < 9)	17 (81%)	19 (76%)
After injection (IgG > 11)	2 (11.8%)	3 (21.4%)

According to a previous clinical trial study, the administration of high-dose influenza vaccines and booster doses appeared to be the most effective strategies for enhancing the immunogenicity of the influenza vaccine in organ transplant recipients [14]. In a study by Natori et al., involving 161 transplant recipients, revealed that a high dose of the influenza vaccine (60 μ g) significantly improved the seroconversion rate (79%) compared to the standard dose (56%). Notably, among the cases showing an enhanced immune response to the vaccine, the Myfortic drug intake was under 2 grams per day. In our study, patients, on average, received 1 gram of Myfortic daily [15]. However, due to the limited sample size and concurrent use of various immunosuppressive treatments, it was challenging to ascertain their distinct impacts on the immunological response within the cohort studied.

In another study conducted in 2018 on 37 kidney transplant patients in the USA, it was found that a 60 μ g dose of the influenza vaccine significantly improved the seroconversion rate for influenza A. Despite the small sample size of this study, the results suggest that a higher antigen dose from the vaccine might enhance the immune response in transplant recipients. However, 60 μ g influenza vaccines are not commercially available outside of North America. Additionally, administering four simultaneous doses of a 15 μ g vaccine in medical centers appears impractical and could result in patient dissatisfaction with the vaccination process [16].

In another large clinical trial study conducted by Cordero et al. in Spain involving 499 transplant recipients, the administration of a booster dose 5 weeks after the initial dose significantly increased the seroconversion rate of all influenza virus strains. It is important to note that the injection of a booster dose of influenza vaccine in patients who underwent organ transplantation brings serious challenges. For instance, to receive the booster, patients must return to the medical facility, posing potential risks for this vulnerable population. Another study by Mombelli et al. in 2018, which evaluated 79 kidney and liver trans-

plant recipients, found that a double dose (30 μ g) of influenza vaccine caused no serious side effects. Similar to our study, the response to the vaccine was suboptimal in this study. However, in contrast to our findings, there was a significant increase in seroconversion rates for all virus strains post-vaccination [13]. Previously, the efficacy of a double influenza vaccine dose was assessed in HIV patients. During the 2009 influenza pandemic, 192 HIV patients were randomized to receive either the standard dose (15 μ g) or a double dose (30 μ g) of the vaccine. Notably, both doses were given concurrently. The seroconversion rate was markedly higher for those who received the double dose (68.5% vs 47.8%). In the 2022 another study by Paget J. et al., it was found that the lack of improved efficacy of the intervention vaccines is unlikely to be explained by additional protection against the B strain (Yamagata) included only in the standard quadrivalent vaccine because influenza B/Yamagata strains were not identified in Switzerland and Spain during the period. Unlike in our study, there was a significant difference in seroconversion rates between the two groups. This could be attributed to the larger sample size and absence of immunosuppressive treatment.

In the 2015 study by GiaQuinta et al., the safety of the triple influenza vaccine was compared in the standard-dose group (15 μ g) and the high-dose group (60 μ g), and no abnormal side effects were reported. However, in the group that received a high dose of influenza vaccine more fatigue and body pain were reported as compared to standard-dose group. Additionally, arm pain was more frequent in high-dose group. However, all of these side effects were mild to moderate and resolved within 3 days after injection similar to our study [6]. In our study, both the single and double doses of the influenza vaccine were well-tolerated, with no serious side effects reported. All adverse reactions were mild to moderate, and no severe side effects were observed in any patient from either group

Strengths and limitations

In this study, administering a double dose of influenza vaccine was associated with an increased immune response in kidney transplant recipients without inducing serious side effects. Double dose of flu vaccine can be considered as a suitable alternative where high dose vaccines are not available. Some limitations, however, should be considered in interpreting the results of the present study. First, the sample size of the study was small, in part due to its concurrent timing with the COVID-19 pandemic and also because some patients did not return for re-serum sampling after 4 weeks. Second, without a comparison of the post-vaccination immunological response in a healthy population, we cannot conclusively discuss the vaccine's immunological effects

and thirdly, due to the heterogeneity of immunosuppressive treatment in our study population, the relationship between the immunological response and Immunosuppressive drugs could not be accurately evaluated.

Conclusion

Compared to the standard dose, the double dose of influenza vaccine was associated with an increase in immunological response in kidney transplant patients. Although the difference was not statistically sig-

nificant but it could be clinically relevant as a double dose of influenza vaccine did not cause any serious side effects. It is suggested that more studies with a larger sample size and longer follow-up along with examining the clinical response to the vaccine and comparing the immunological and clinical response across population and with healthy individuals. Additionally, future research should compare the effects of various immunosuppressive treatment regimens on the immunological response after administering both the standard and double doses of the seasonal influenza vaccine to kidney transplant recipients.

References

- Chong P.P., Handler L., Weber D.J. A systematic review of safety and immunogenicity of influenza vaccination strategies in solid organ transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.*, 2018, vol. 66, no. 11, pp. 1802–1811. doi: 10.1093/cid/cix1081
- Control CfD, Prevention. Seasonal influenza: flu basics. URL: <http://www.cdc.gov/flu/about/disease/index.htm> [Last accessed: 2017, Feb 20], 2014.
- Cordero E., Pérez-Romero P., Moreno A., Len O., Montejo M., Vidal E., Martín-Dávila P., Fariñas M.C., Fernández-Sabé N., Giannella M., Pachón J.; Novel influenza A(H1N1) Study Group of Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Pandemic influenza A(H1N1) virus infection in solid organ transplant recipients: impact of viral and non-viral co-infection. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, vol. 18, no. 1, pp. 67–73. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03537.x
- Cordero E., Roca-Oporto C., Bulnes-Ramos A., Aydillo T., Gavalda J., Moreno A., Torre-Cisneros J., Montejo J.M., Fortun J., Muñoz P., Sabé N., Fariñas M.C., Blanes-Julia M., López-Medrano F., Suárez-Benjumea A., Martínez-Atienza J., Rosso-Fernández C., Pérez-Romero P.; TRANSGRIPE 1–2 Study Group. Two doses of inactivated influenza vaccine improve immune response in solid organ transplant recipients: results of TRANSGRIPE 1-2, a randomized controlled clinical trial. *Clin. Infect. Dis.*, 2017, vol. 64, no. 7, pp. 829–838. doi: 10.1093/cid/ciw855
- El Sahly H.M., Davis C., Kotloff K., Meier J., Winokur P.L., Wald A., Johnston C., George S.L., Brady R.C., Lehmann C., Stokes-Riner A., Keitel W.A. Higher antigen content improves the immune response to 2009 H1N1 influenza vaccine in HIV-infected adults: a randomized clinical trial. *J. Infect. Dis.*, 2012, vol. 205, no. 5, pp. 703–712. doi: 10.1093/infdis/jir837
- GiaQuinta S., Michaels M.G., McCullers J.A., Wang L., Fonnesebeck C., O’Shea A., Green M., Halasa N.B. Randomized, double-blind comparison of standard-dose vs. high-dose trivalent inactivated influenza vaccine in pediatric solid organ transplant patients. *Pediatr. Transplant.*, 2015, vol. 19, no. 2, pp. 219–228. doi: 10.1111/ptr.12419
- Iuliano A.D., Roguski K.M., Chang H.H., Muscatello D.J., Palekar R., Tempia S., Cohen C., Gran J.M., Schanzer D., Cowling B.J., Wu P., Kyncl J., Ang L.W., Park M., Redlberger-Fritz M., Yu H., Espenhain L., Krishnan A., Emukule G., van Asten L., Pereira da Silva S., Aungkulanon S., Buchholz U., Widdowson M.A., Bresee J.S.; Global Seasonal Influenza-associated Mortality Collaborator Network. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*, 2018, vol. 391, no. 10127, pp. 1285–1300. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33293-2
- Izurrieta H.S., Thompson W.W., Kramarz P., Shay D.K., Davis R.L., DeStefano F., Black S., Shinefield H., Fukuda K. Influenza and the rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children. *N. Engl. J. Med.*, 2000, vol. 342, no. 4, pp. 232–239. doi: 10.1056/NEJM200001273420402
- Kumar D., Ferreira V.H., Blumberg E., Silveira F., Cordero E., Perez-Romero P., Aydillo T., Danziger-Isakov L., Limaye A.P., Carratala J., Munoz P., Montejo M., Lopez-Medrano F., Farinas M.C., Gavalda J., Moreno A., Levi M., Fortun J., Torre-Cisneros J., Englund J.A., Natori Y., Husain S., Reid G., Sharma T.S., Humar A. A 5-year prospective multicenter evaluation of influenza infection in transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.*, 2018, vol. 67, no. 9, pp. 1322–1329. doi: 10.1093/cid/ciy294
- Kumar D., Michaels M.G., Morris M.I., Green M., Avery R.K., Liu C., Danziger-Isakov L., Stosor V., Estabrook M., Gantt S., Marr K.A., Martin S., Silveira F.P., Razonable R.R., Allen U.D., Levi M.E., Lyon G.M., Bell L.E., Huprikar S., Patel G., Gregg K.S., Pursell K., Helmersen D., Julian K.G., Shiley K., Bono B., Dharnidharka V.R., Alavi G., Kalpoe J.S., Shoham S., Reid G.E., Humar A.; American Society of Transplantation H1N1 Collaborative Study Group. Outcomes from pandemic influenza A H1N1 infection in recipients of solid-organ transplants: a multicentre cohort study. *Lancet Infect. Dis.*, 2010, vol. 10, no. 8, pp. 521–526. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70133-X
- Manuel O., Estabrook M.; American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. RNA respiratory viral infections in solid organ transplant recipients: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin. Transplant.*, 2019, vol. 33, no. 9: e13511. doi: 10.1111/ctr.13511
- Miskulin D.C., Weiner D.E., Tighiouart H., Lacson E.K. Jr., Meyer K.B., Dad T., Manley H.J. High-dose seasonal influenza vaccine in patients undergoing dialysis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2018, vol. 13, no. 11, pp. 1703–1711. doi: 10.2215/CJN.03390318
- Mombelli M., Neofytos D., Huynh-Do U., Sánchez-Céspedes J., Stampf S., Golshayan D., Dahdal S., Stirnimann G., Schnyder A., Garzoni C., Venzin R.M., Magenta L., Schönenberger M., Walti L., Hirzel C., Munting A., Dickenmann M., Koller M., Aubert J.D., Steiger J., Pascual M., Mueller T.F., Schuurmans M., Berger C., Binet I., Villard J., Mueller N.J., Egli A., Cordero E., van Delden C., Manuel O. Immunogenicity of high-dose versus MF59-adjuvanted versus standard influenza vaccine in solid organ transplant recipients: the swiss/spanish trial in solid organ transplantation on prevention of influenza (STOP-FLU Trial). *Clin. Infect. Dis.*, 2024, vol. 78, no. 1, pp. 48–56. doi: 10.1093/cid/ciad477

14. Mombelli M., Rettby N., Perreau M., Pascual M., Pantaleo G., Manuel O. Immunogenicity and safety of double versus standard dose of the seasonal influenza vaccine in solid-organ transplant recipients: a randomized controlled trial. *Vaccine*, 2018, vol. 36, no. 41, pp. 6163–6169. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.08.057
15. Natori Y., Shiotsuka M., Slomovic J., Hoschler K., Ferreira V., Ashton P., Rotstein C., Lilly L., Schiff J., Singer L., Humar A., Kumar D. A double-blind, randomized trial of high-dose vs standard-dose influenza vaccine in adult solid-organ transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.*, 2018, vol. 66, no. 11, pp. 1698–1704. doi: 10.1093/cid/cix1082
16. Paget J., Caini S., Del Riccio M., van Waarden W., Meijer A. Has influenza B/Yamagata become extinct and what implications might this have for quadrivalent influenza vaccines? *Euro Surveill.*, 2022, vol. 27, no. 39: 2200753. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.39.2200753

Авторы:

Мейдани М., доцент кафедры инфекционных болезней, отделение инфекционных болезней, больница Имама Хомейни, больничный комплекс Имама Хомейни, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;

Хатами М., профессор нефрологии, Научно-исследовательский центр нефрологии, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;

Абдоллахи А., профессор патологии, отделение патологии, медицинский факультет, больница Имама Хомейни, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;

Мирзапур П., к.п.н., постдок-исследователь Иранского исследовательского центра по ВИЧ/СПИД, Иранский институт снижения рискованного поведения, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;

Каримян Э., специалист по инфекционным заболеваниям, Школа медицины, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;

СейедАлиаги С., д.м.н., магистр философии, доктор философии, доцент, Иранский исследовательский центр ВИЧ/СПИДа, Иранский институт снижения поведения высокого риска, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран.

Authors:

Meidani M., Associate Professor of Infectious Disease, Department of Infectious Diseases, Imam Khomeini Hospital, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Khatami M., Professor of Nephrology, Nephrology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Abdollahi A., Professor of Pathology, Department of Pathology, School of Medicine, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Mirzapour P., PhD in Psychology and Postdoc Researcher of Iranian Research Center for HIV/AIDS, Iranian Institute for Reduction of High-Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

Karimian E., Infectious Disease Specialist, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

SeyedAlinaghi S., MD, MPhil, PhD, Associate Professor, Iranian Research Center for HIV/AIDS, Iranian Institute for Reduction of High-Risk Behaviors, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Поступила в редакцию 11.12.2023
Отправлена на доработку 10.01.2024
Принята к печати 25.02.2024

Received 11.12.2023
Revision received 10.01.2024
Accepted 25.02.2024

SPECIES DISTRIBUTION AND ANTIMICROBIAL SENSITIVITY PATTERN OF ETIOLOGIC AGENTS IN PATIENTS WITH NEONATAL SEPSIS, NATIONAL CHILDREN'S HOSPITAL, HA NOI, VIETNAM, 2019–2021

T.T. Thang^{a,*}, H.D. Canh^{b,*}, N.T.N. Tu^c, T.D. Thang^d, L.T.P. Lan^e, C.B. Loi^b, L.T. Anh^f

^a Nghe An Eye Hospital, Nghe An, Vietnam

^b National Institute of Malaria, Parasitology and Entomology, Ha Noi, Vietnam

^c National Children's Hospital, Ha Noi, Vietnam

^d Thai Thuong Hoang Hospital, Nghe An, Vietnam

^e Vietnam Food Safety Authority, Ministry of Health, Ha Noi, Vietnam

^f Vietnam Military Medical University, Ha Noi, Vietnam

Abstract. Neonatal sepsis is one of the significant causes of morbidity and mortality in neonates, especially in developing countries. This study investigates the species distribution and antimicrobial susceptibility pattern of agents causing neonatal sepsis in a northern hospital in Vietnam. *Materials and methods.* All in-term neonates treated at the Neonatal Center, National Children's Hospital, Vietnam between December 2019, and April 2021 who met the clinical criteria for sepsis and positive blood cultures were enrolled. Species identification and antimicrobial susceptibility testing were performed with Vitek 2 Compact (bioMerieux, France). *Results.* Eighty-five neonates were included with the majority of cases being early-onset sepsis (61.2%, 95% CI: 50.6–71.8%). Gram-negative, Gram-positive, and fungal isolates constituted 50.6%, 40%, and 9.4%, respectively. The most common agent was *Staphylococcus aureus* (28.2%) followed by *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* (16.5% each). For those with bacteriological sepsis, Gram-negative pathogens were predominant in early-onset sepsis whereas Gram-positive pathogens were predominant in late-onset sepsis (75.0% (33/44) vs 69.7% (23/33), $p < 0.001$). Antibiotic resistance was common among bacterial isolates, but antifungal resistance was not detected among isolates of *Candida* sp. Vancomycin and fluoroquinolone were very effective against Gram-positive organisms while piperacillin + tazobactam, aztreonam, and ertapenem were potent drugs against Gram-negative organisms. *Conclusion.* Routine investigation of microbial profiles and antimicrobial susceptibility patterns is essential to guiding strategies for the choices of empirical antimicrobials.

Key words: neonatal sepsis, species, antimicrobial susceptibility, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*.

* The authors contributed equally to this work and act as joint first authors.

Адрес для переписки:

Ле Чан Ань
Вьетнам, Ханой, Ха Донг, Фунг Хынг, 160,
кафедра паразитологии, Вьетнамский военно-медицинский
университет.
Тел.: +84983289514.
E-mail: anh_lt@vmmu.edu.vn

Contacts:

Le Tran Anh
Vietnam, Ha Noi, Ha Dong, Phung Hung, 160,
Department of Parasitology, Vietnam Military Medical University.
Phone: +84983289514.
E-mail: anh_lt@vmmu.edu.vn

Для цитирования:

Тханг Ч.Т., Канх Х.Д., Ту Н.Т.Н., Тханг Т.Д., Лан Л.Т.П., Лой К.Б.,
Ань Л.Ч. Видовое распределение и характеристика антимикробной
чувствительности этиологических агентов у пациентов с сепсисом
новорожденных по данным Национальной детской больницы (Ханой,
Вьетнам) за период 2019–2021 гг. // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14,
№ 1. С. 133–140. doi: 10.15789/2220-7619-SDA-2079

Citation:

Thang T.T., Canh H.D., Tu N.T.N., Thang T.D., Lan L.T.P., Loi C.B., Anh L.T.
Species distribution and antimicrobial sensitivity pattern of etiologic agents
in patients with neonatal sepsis, National children's hospital, Ha Noi,
Vietnam, 2019–2021 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 133–140. doi: 10.15789/2220-7619-
SDA-2079

© Thang T.T. et al., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-SDA-2079>

ВИДОВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИМИКРОБНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭТИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ У ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ НОВОРОЖДЕННЫХ ПО ДАННЫМ НАЦИОНАЛЬНОЙ ДЕТСКОЙ БОЛЬНИЦЫ (ХАНОЙ, ВЬЕТНАМ) ЗА ПЕРИОД 2019–2021 гг.

Ч.Т. Тханг¹, Х.Д. Канх², Н.Т.Н. Ту³, Т.Д. Тханг⁴, Л.Т.П. Лан⁵, К.Б. Лой², Л.Ч. Ань⁶

¹ Глазная больница Нге Ан, Нге Ан, Вьетнам

² Национальный институт малярии, паразитологии и энтомологии, Ханой, Вьетнам

³ Национальная детская больница, Ханой, Вьетнам

⁴ Больница Тхай Тхьонг Хоанг, Нге Ан, Вьетнам

⁵ Управление безопасности пищевых продуктов Вьетнама, Министерство здравоохранения, Ханой, Вьетнам

⁶ Вьетнамский военно-медицинский университет, Ханой, Вьетнам

Резюме. Неонатальный сепсис является одной из основных причин заболеваемости и смертности новорожденных, особенно в развивающихся странах. Настоящее исследование было направлено на изучение видового распределения бактерий, вызывающих неонатальный сепсис, и профиля их чувствительности к противомикробным препаратам в больнице на севере Вьетнама. *Материалы и методы.* В исследование были включены все доношенные новорожденные, проходившие лечение в неонатальном центре Национальной детской больницы Вьетнама в период с декабря 2019 г. по апрель 2021 г., которые соответствовали клиническим критериям сепсиса и у которых был получен положительный результат посева крови. Идентификацию видов возбудителей и определение чувствительности к противомикробным препаратам проводили с помощью бактериологического анализатора «Vitek 2 Compact» (bioMérieux, Франция). *Результаты.* В исследовании приняли участие 85 новорожденных, у большинства из которых отмечен сепсис с ранним началом (61,2%, 95% ДИ: 50,6–71,87%). Грамотрицательные, грамположительные и грибковые изоляты составляли 50,6, 40 и 9,4% соответственно. Наиболее частым возбудителем был *Staphylococcus aureus* (28,2%), за ним следовали *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* (по 16,5%). У больных с бактериальным сепсисом грамотрицательные возбудители преобладали при сепсисе с ранним началом, тогда как грамположительные возбудители — при сепсисе с поздним началом (75,0% (33/44) против 69,7% (23/33), $p < 0,001$). У бактериальных изолятов часто выявлялась устойчивость к антибиотикам, тогда как у изолятов *Candida* spp. резистентности к противогрибковым препаратам установлено не было. Ванкомицин и фторхинолон были крайне эффективны в отношении грамположительных микроорганизмов, в то время как пиперациллин + тазобактам, азтреонам и эртапенем проявляли выраженную активность против грамотрицательных микроорганизмов. *Выводы.* Рутинное исследование микробных профилей и моделей чувствительности к противомикробным препаратам имеет важное значение для определения стратегии выбора эмпирических противомикробных препаратов.

Ключевые слова: неонатальный сепсис, виды, антимикробная чувствительность, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*.

Introduction

Neonatal sepsis is one of the significant causes of morbidity and mortality in neonates, especially in developing countries. Globally, neonatal sepsis is estimated to cause from 1.3 to 3.9 million cases and between 400 000 and 700 000 deaths annually [41]. The mortality rate for neonatal sepsis is between 1% and 5% for sepsis and 9% to 20% for severe sepsis [14]. Furthermore, the rate of mortality is not equal and far higher in developing countries (roughly ~34/1000 live births) compared to that in developed countries (~5/1000) [4]. One of the main challenges to the effective management of neonatal sepsis is the occurrence of antimicrobial resistance among clinically relevant pathogens [45]. For this reason, an antimicrobial regime to treat causative agents is ideally based on the results of blood culture and drug sensitivity tests [32]. However, these results are available only for cases with positive blood cultures, the technique that is considered the gold standard for diagnosis but lacks sensitivity and cannot produce results quickly [34]. So early initiation of empiric antimicrobial therapy

based on updated data on the local profile of species distribution and antimicrobial resistance of causative pathogens is very important [18, 24]. In addition, this approach could reduce the inappropriate use of antibiotics, and consequently, reduce the emergence of antimicrobial-resistant pathogens [5].

Vietnam is a developing country and infection is still the leading primary cause of hospital admission and mortality in neonates [37]. Geographically, Vietnam is divided into northern, central, and southern regions. There have been some reports of causative microorganisms of neonatal sepsis from the central and south of Vietnam, but data from northern Vietnam is limited [35, 36]. We conducted this study to investigate the species distribution and antimicrobial susceptibility pattern of agents causing neonatal sepsis in a northern hospital in Vietnam.

Materials and methods

Ethical consideration. This retrospective study is part of thesis work for the fulfillment of Doctor of Philosophy in Health Studies and obtained clearance

from the ethics committee of the Vietnam National Institute of Malaria, Parasitology and Entomology (NIMPE). Written or verbal consent was obtained from all the legal representatives of the patients.

This study was carried out at the Neonatal Centre, National Children's Hospital, Vietnam between December 2019, and April 2021. Agent isolation and analysis were done in the laboratories of the Department of Microbiology, National Children's Hospital.

Data collection. All in-term newborns (0–28 days of age) visiting the Centre with clinical symptoms/signs that met the criteria for sepsis and positive results of blood culture were enrolled in the study. Patients receiving blood or having severe congenital diseases that affect vital function were excluded from the study. Demographic and clinical findings were obtained from electronic medical records using a standardized case report form.

Microorganism analysis. To isolate the responsible agents for sepsis, 2 ml of blood were collected from two different sites and subjected to culture in two bottles, one for aerobic bacteria and one for anaerobic bacteria or fungi according to the adjustment of responsible clinicians. Species identification and antimicrobial susceptibility testing (AST) were performed with “Vitek 2 Compact” (using VITEK® 2 GN ID, VITEK® 2 GP ID and VITEK® 2 YST ID cards for identification of Gram-negative, Gram-positive isolates and yeast respectively, AST GN 86, AST GP 67 and AST-YS08 GN cards for AST of GN, GP and yeast respectively, bioMérieux, France) following the manufacturer's instructions.

Definition. The diagnosis of neonatal sepsis in the present study was based on criteria issued by European Medicines Agency [12]. An infection presented between birth and 72 hours of life was classified as early-onset sepsis (EOS) and “late-onset sepsis” (LOS) was sepsis that occurs after 72 hours of life. The minimum inhibition concentration (MICs) was categorised as S (susceptible) and R (resistant) according to species-specific breakpoints established by the Clinical and Laboratory Standards Institute [6, 7, 8].

Statistics. Data were analyzed using SPSS software version 20.0. Categorical data were described by case number (n) and percentages. Continuous data were expressed as mean±standard deviation (SD). Categorical variables were compared by Chi-square test and the accepted level of significance was two-tailed $p < 0.05$.

Results

During the study period, 85 in-term neonates met the included criteria and were enrolled. The male-to-female patient ratio was 1.2:1 and the mean age of gestation was 38.6 weeks. About one-quarter of neonates had low birth weight but none had very low birth weight (< 1.5 kg). More than half of them

Table 1. Baseline characteristics of 85 patients recruited with neonatal sepsis

Variable	% (CI 95%) or mean±SD	
Demographic features		
Gender	Male	54.1 (43.3–64.9)
	Female	45.9 (35.1–56.7)
Age (days)	10.4±8.2	
Birth weight (grams)	2918.2±548	
Low birth weight (≤ 2500 g)	25.9 (16.4–23.2)	
Gestation age (weeks)	38.6±1.1	
Onset of sepsis	EOS	61.2 (50.6–71.8)
	LOS	38.8 (28.3–49.4)
Maternal features		
Mode of delivery*	SVD	50.6 (39.7–61.4)
	CS	49.4 (38.6–60.3)
History of infection during the gestation period#	15.3 (7.5–23.10)	

Note. *CS Cesarean Section, SVD Spontaneous Vaginal Delivery. #Mothers with history of infection included 8 with genital infection, 7 with bronchitis, gingivitis, or urinary tract infections, and 2 with chorioamnionitis.

were delivered by SVD and about one-fifth of the neonates' mothers had a history of infection during the gestational period. The majority of cases were defined as EOS (61.2%) (Table 1).

There were 85 microbial isolates belonging to 19 different kinds of organisms. Bacteria composed the most (90.6%) while fungi accounted for only 9.4% of the isolates. For those with bacteriological sepsis, Gram-negative (GN) isolates were more common than Gram-positive (GP) isolates (55.8% and 44.2% respectively). In all groups, the most predominant agent was *S. aureus* (28.2%) while *K. pneumoniae* and *E. coli* (16.5% each) were the predominant causative agents in GN bacteria. Gram-negative pathogens were predominant in EOS whereas GP pathogens were predominant in LOS [75.0% (33/44) vs 69.7% (23/33), $p < 0.001$]. There were 5 species of fungi recovered and *C. albicans* was the most prevalent agent (50%, 4/8). All cases with candidemia were classified as EOS (Table 2).

Gram-positive isolates were associated with minimal sensitivity to clindamycin (13.0%), oxacillin (14.3%), and benzyl penicillin (17.9%). Of note, 90.0–95.2% of GP bacteria were sensitive to fluoroquinolone and 100% of isolates were sensitive to vancomycin. *S. aureus* (the most common pathogen isolated) showed high sensitivity to vancomycin, fluoroquinolones (100%), and gentamicin (83.3%) (Table 3).

Gram-negative isolates demonstrated a low sensitivity to cefotaxime (8.3%), ampicillin + sulbactam (9.5%), ceftazidime (45.8%), and cefoxitin (50.0%), moderate sensitivity to ciprofloxacin (60%), moxifloxacin (69.2%), tobramycin (63.2%), ceftriaxone (63.6%), amikacin (68.6%), and imipenem (72.7%). The drugs that show high efficacy against GN organisms was piperacillin + tazobactam (sensitivity

Table 2. Distribution of bloodstream infection isolates

Groups	Species	EOS	LOS	Total	%
Gram-negative	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	2	14	16.5
	<i>Escherichia coli</i>	7	7	14	16.5
	<i>Serratia marcescens</i>	4	0	4	4.7
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	0	3	3.5
	<i>Burkholderia cepacia</i>	2	1	3	3.5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2	2.4
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	1	0	1	1.2
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0	1	1.2
	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1	0	1	1.2
	Subtotal	33	10	43	50.6
Gram-positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	19	24	28.2
	GBS*	3	4	7	8.2
	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	0	1	1.2
	<i>Enterococcus faecium</i>	1	0	1	1.2
	<i>Bacillus cereus</i>	1	0	1	1.2
	Subtotal	11	23	34	40.0
Fungi	<i>Candida albicans</i>	4	0	4	4.7
	<i>Candida tropicalis</i>	1	0	1	1.2
	<i>Candida krusei</i>	1	0	1	1.2
	<i>Candida parapsilosis</i>	1	0	1	1.2
	<i>Candida guilliermondii</i>	1	0	1	1.2
	Subtotal	8	0	8	9.4
	Total	52	33	85	100

Note. *GBS: Group B streptococcus.

Table 3. Profile of antimicrobial sensitivity among Gram-positive isolates*

Groups	Antibiotics	<i>S. aureus</i>	GBS	Other	Total	%
Aminoglycosides	Amikacin		1/2	0/1	1/3	33.3
	Gentamycin	15/18	0/1		15/19	78.9
Beta-lactam	Benzyl penicillin	0/22	5/6		5/28	17.9
	Oxacillin	0/23	4/4	0/1	4/28	14.3
	Ticarcillin		0/1		0/1	0.0
	Cefazolin		0/1		0/1	0.0
	Cefoxitin		0/1		0/1	0.0
	Ceftriaxon		2/3	0/1	2/4	50.0
	Cefoperazone		0/1		0/1	0.0
	Ceftazidim		0/1		0/1	0.0
	Cefotaxim		2/3		2/3	66.7
	Cefepime		0/1	0/1	0/2	0.0
	PiTa [#]	1/1	1/2	0/1	2/4	50.0
	AmS ^{**}	1/1	2/4	1/2	4/7	57.1
	Aztreonam		0/1		0/1	0.0
	Ertapenem		0/1	0/1	0/2	0.0
	Meropenem	2/2	0/1		2/3	66.7
Imipenem		0/1	1/1	1/2	50.0	
Fluoroquinolone	Ciprofloxacin	17/17	0/1	1/2	18/20	90.0
	Moxifloxacin	15/15	5/5	0/1	20/21	95.2
	Levofloxacin	20/20	5/6	0/1	25/27	92.6
Glycopeptide	Vancomycin	24/24	7/7	2/2	33/33	100
Lincosamide	Clindamycin	1/16	2/7		3/23	13.0

Notes. *N = number of sensitive isolates/Number of tested isolates. #PiTa: Piperacillin + tazobactam. **AmS: Ampicillin + sulbactam.

Table 4. Profile of antimicrobial sensitivity among Gram-negative isolates*

Groups	Antibiotics	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	Other	Total	%
Aminoglycosides	Amikacin	8/14	12/13	4/8	24/35	68.6
	Gentamycin	3/11	7/13	4/6 6/10	16/34	47.1
	Tobramycin	4/8	4/6	4/5	12/19	63.2
Beta-lactam	Cefazolin		1/1	0/1	1/2	50.0
	Cefoxitin	3/8	5/9	2/3	10/20	50.0
	Ceftriaxon	4/8	6/9	4/5	14/22	63.6
	Cefoperazone	1/1			1/1	100.0
	Ceftazidim	5/11	4/6	2/7	11/24	45.8
	Cefotaxim	0/6	0/2	1/4	1/12	8.3
	Cefepime	2/2	4/4	1/2	7/8	87.5
	PiTa [#]	5/5	3/3	2/3	10/11	90.9
	AmS ^{**}	0/9	2/11	0/1	2/21	9.5
	Aztreonam	5/5	4/5	3/3	12/13	92.3
	Ertapenem	6/6	4/5	3/3	13/14	92.9
	Meropenem	3/4	3/6	4/6	10/16	62.5
Imipenem	6/8	8/11	2/3	16/22	72.7	
Fluoroquinolone	Ciprofloxacin	5/8	3/7	7/10	15/25	60.0
	Moxifloxacin	4/8	2/4	3/5	9/13	69.2
	Levofloxacin	4/8	4/8	10/13	18/29	62.1

Notes. *N = number of sensitive isolates/Number of tested isolates. #PiTa: Piperacillin + tazobactam. **AmS: Ampicillin + sulbactam.

rate of 90.9%), aztreonam (92.3%), and ertapenem (92.9%) (Table 4).

Resistance to tested antifungals (caspofungin, fluconazole, micafungin, voriconazole, fluorocytosine, amphotericin B) was not detected among isolates of *Candida* spp.

Discussion

There were 85 in-term neonates involved in this study. The characteristics of our patients were comparable to those in some other studies in Vietnam reporting the predominance of males, and EOS among patients with neonatal sepsis [35, 36, 37].

The predominance of bacteria as the causative agent of neonatal sepsis (90.6%) in our study is in line with many previous reports [23, 29, 44]. The majority of GN isolates among patients with bacteriological sepsis is identical to those previously reported in India [29], Myanmar [28] and Vietnam [23]. Similarly, the majority of GN organisms among EOS and GP bacteria among LOS patients in our patients are concordant with those in the literature [3, 46]. A very high prevalence of GN organisms among EOS sepsis (90.4%) has been reported in Indonesia [31].

Considering single species, the leading cause of neonatal sepsis was *S. aureus* (28.2%), followed by *K. pneumoniae* and *E. coli*. Our results seem to replicate previous data demonstrating the predominance of *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *E. coli* as the causative agents of neonatal sepsis in developing countries [15, 40]. Surprisingly, the prevalence of *S. aureus* in our study was high which diverges from the very low rates (4–4.5%) reported in central and south-

ern Vietnam [35, 37]. However, our result conforms with those reported in Ethiopia [16], and India [22]. In our opinion, this difference could reflect the geographic variation of agents causing neonatal sepsis and emphasize the importance of routine investigation of the distribution species to get updated profiles of aetiologic organisms in different regions [38]. Of the GN organisms, *K. pneumoniae*, *E. coli* were the most common isolates (16.5%) which was in accordance with other findings in Vietnam [23, 35]. The rate of sepsis caused by GBS in our study (8.2%, 7/85) was lower than that in developed countries (43–58%) [46]. This minority may be the consequence of the low prevalence of GBS colonization among pregnant women in Vietnam [11, 17]. In the literature, the incidence of neonatal sepsis caused by GBS in Asia is usually low in comparison with other regions [25]. The recovery of some rare agents such as *Enterobacter cloacae* complex [2], *Stenotrophomonas maltophilia* [26], *Elizabethkingia meningoseptica* [28], *Listeria monocytogenes* [21], *Enterococcus faecium* [13], *Bacillus cereus* [20] has been reported elsewhere.

The second objective of our study is to determine the antimicrobial pattern of agents causing neonatal sepsis. Results in Tables 3 and 4 show that: (1) antibiotic resistance was common for bacterial agents while all fungal isolates were sensitive to the tested antifungal, (2) vancomycin and fluoroquinolone were very effective against GP bacteria while piperacillin + tazobactam, aztreonam, and ertapenem were potent drugs against GN organisms.

The resistance to antibiotics commonly used for empirical therapy such as fluoroquinolones and β -lactams (carbapenems, cephalosporins, and penicillins) [9, 27, 42] occurs in almost all bacterial species

despite a small number of the tested isolates. The decreased susceptibility of bacteria to these drugs in the present study follows the trend described previously and may pose a further challenge to clinical practice in Vietnam [23, 37, 39]. In contrast, antifungal resistance was not observed among all fungal isolates. The absence of antifungal resistance could be due to the predominance of *C. albicans* in the current study, a species with rare antifungal resistance [32].

Among the tested antibiotics, vancomycin and fluoroquinolone were very effective against GP bacteria while piperacillin + tazobactam, aztreonam, and ertapenem were potent drugs against GN organisms. The potent efficacy of vancomycin against GP isolates in our study is in line with some other reports [23, 37, 39]. On a global scale, resistance to vancomycin among GP organisms is very rare [1]. It is worth noting that GP isolates in the present study seemed to have higher rates of sensitivity to fluoroquinolones (90.0–95.2%) than that in prior studies done in Vietnam (75–78%) [23, 36] and Myanmar (72.3–77%) [28]. In contrast, GN isolates demonstrated moderate susceptibility to fluoroquinolones but high sensitivity to piperacillin + tazobactam, aztreonam, and ertapenem. The moderate sensitive rate of GN organisms to fluoroquinolone in the current study (60.0–69.2%) was in the range of those reported from 13 hospitals in Vietnam (between 18–62%) [39]. The potent efficacy of ertapenem, a drug belonging to the carbapenem class, replicates findings from prior studies [23, 36, 39]. The susceptibility profile of GN bacteria to piperacillin + tazobactam

in Vietnam is limited but a study carried out in Brazil found comparable results with our study [30]. Aztreonam is the only monobactam currently approved by the FDA and selectively active against GN bacteria [10], however, this drug has rarely been used in Vietnam [9, 27, 39]. These results may have practical implications for clinicians when instituting antimicrobial therapy.

Conclusion

In conclusion, our data showed the majority of neonatal sepsis was early-onset sepsis. Gram-negative bacteria were predominant in neonatal sepsis and early-onset sepsis while late-onset septicemia is mainly caused by Gram-positive pathogens. Antibiotic resistance was common but antifungal resistance was not reported. Vancomycin and fluoroquinolone were very effective against Gram-positive organisms while piperacillin + tazobactam, aztreonam, and ertapenem were potent drugs against GN organisms. These findings suggest the selection of empirical antimicrobials when neonatal sepsis is suspected or proven. Routine investigation of microbial profiles and antimicrobial susceptibility patterns is essential to guiding strategies for the choices of empirical antimicrobials.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

References

1. Akova M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence*, 2016, vol. 7, no. 3, pp. 252–66. doi: 10.1080/21505594.2016.1159366
2. Alharbi A.S. Common bacterial isolates associated with neonatal sepsis and their antimicrobial profile: a retrospective study at King Abdulaziz University Hospital, Jeddah, Saudi Arabia. *Cureus*, 2022, vol. 14, no. 1: e21107 doi: 10.7759/cureus.21107
3. Ba-Alwi N.A., Aremu J.O., Ntim M., Takam R., Msuya M.A., Nassor H., Ji H. Bacteriological profile and predictors of death among neonates with blood culture-proven sepsis in a National hospital in Tanzania — a retrospective cohort study. *Front. Pediatr.*, 2022, no. 10: 797208. doi: 10.3389/fped.2022.797208
4. Black R.E., Cousens S., Johnson H.L., Lawn J.E., Rudan I., Bassani D.G., Jha P., Campbell H., Walker C.F., Cibulskis R., Eisele T., Liu L., Mathers C. Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*, 2010, vol. 375, no. 9730, pp. 1969–1987. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60549-1
5. Carl L., Bjerrum L. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther. Adv. Drug Saf.*, 2014, vol. 5, no. 6, pp. 229–241. doi: 10.1177/2042098614554919
6. Clinical and Laboratory Standard Institute. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A3. 3rd ed. 2008. Wayne, PA.
7. Clinical and Laboratory Standard Institute. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Fourth International Supplement. CLSI Document M27-4. 2012. Wayne, PA.
8. Clinical and Laboratory Standard Institute. Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically; Approved Standard, M07-A10. 10th ed. 2015. Wayne, PA.
9. Dat V.Q., Tran T.D., Vu Q.H., Kim B.G., Satoko O. Antibiotic use for empirical therapy in the critical care units in primary and secondary hospitals in vietnam: a multicenter cross-sectional study. *Lancet Regional Health — Western Pacific*, 2022, vol. 18: 100306. doi: 10.1016/j.lanwpc.2021.100306
10. Doi Y. Ertapenem, imipenem, meropenem, doripenem, and aztreonam. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Eds. J.E. Bennett, R. Dolin, M.J. Blaser. Philadelphia: Elsevier, 2020. pp. 285–290.
11. Du V.V., Dung P.T., Toan N.L., Mao C.V., Bac N.T., Tong H.V., Son H.A., Thuan N.D., Viet N.T. Antimicrobial resistance in colonizing group b streptococcus among pregnant women from a hospital in Vietnam. *Sci. Rep.*, 2011, vol. 11, no. 1: 20845. doi: 10.1038/s41598-021-00468-3

12. European Medicines Agency. 2010. Report on the Expert Meeting on Neonatal and Paediatric Sepsis. London, England. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2010/12/WC500100199.pdf (14.08.2020)
13. Fernández F.J.F., Aguado J.F., González M.R., Fernández S.P., Fernández M.A., Germañas A.N., Pérez-Argüelles B.S., Fernández C.M.V. Enterococcus faecalis bacteremia. *Rev. Clin. Esp.*, 2004, no. 204, pp. 244–250. doi: 10.1016/S0014-2565(04)71449-6
14. Fleischmann-Struzek C., Goldfarb D.M., Schlattmann P., Schlapbach L.J., Reinhart K., Kisson N. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *Lancet. Respiratory Medicine*, 2018, vol. 6, no. 3, pp. 223–230. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30063-8
15. Fleischmann C., Reichert F., Cassini A., Horner R., Harder T., Markwart R., Tröndle M., Savova Y., Kisson N., Schlattmann P., Reinhart K., Allegranzi B., Eckmanns T. Global incidence and mortality of neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Dis. Child.*, 2021, vol. 106, no. 8, pp. 745–752. doi: 10.1136/archdischild-2020-320217
16. G/Eyesus T., Moges F., Eshetie S., Yeshitela B., Abate E. Bacterial etiologic agents causing neonatal sepsis and associated risk factors in Gondar, Northwest Ethiopia. *BMC Pediatr.* 2017, vol. 17, no. 1: 137. doi: 10.1186/s12887-017-0892-y
17. Hanh T.Q., Van Du V., Hien P.T., Chinh D.D., Loi C.B., Dung N.M., Anh D.N., Anh T.T.K. Prevalence and capsular type distribution of group B Streptococcus isolated from vagina of pregnant women in Nghe An province, Vietnam. *Iran J. Microbiol.*, 2020, vol. 12, no. 1, pp. 11–17.
18. Harbarth S., Garbino J., Pugin J., Romand J.A., Lew D., Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am. J. Med.*, 2003, vol. 115, no. 7, pp. 529–535. doi: 10.1016/j.amjmed.2003.07.005
19. Hao T.K., Vo-Van N.L., Hoa N.T.K., Anh L.T.P. Neonatal morbidity and mortality in a neonatal unit in a vietnamese hospital. *Iran. J. Neonatol.*, 2022, vol. 13, no. 2. doi: 10.22038/IJN.2022.59669.2132
20. Hilliard N.J., Schelonka R.L., Waites K.B. Bacillus cereus bacteremia in a preterm neonate. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, no. 7, pp. 3441–3444. doi: 10.1128/JCM.41.7.3441-3444.2003
21. Ilboudo C.M., Jackson M.A. Early onset neonatal sepsis and meningitis. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.*, 2014, vol. 3, no. 4, pp. 354–357. doi: 10.1093/jpids/piu003
22. Karthikeyan G., Premkumar K. Neonatal sepsis: Staphylococcus aureus as the predominant pathogen. *Indian J. Pediatr.*, 2001, vol. 68, no. 8, pp. 715–717. doi: 10.1007/BF02752407
23. Kruse A.Y., Chuong D.H.T., Phuong C.N., Duc T., Stensballe L.G., Prag J., Kurtzhals J., Greisen G., Pedersen F.K. Neonatal bloodstream infections in a pediatric hospital in Vietnam: a cohort study. *J. Trop. Pediatr.*, 2013, vol. 59, no. 6, pp. 483–488. doi: 10.1093/tropej/fmt056
24. Kumar A., Ellis P., Arabi Y., Roberts D., Light B., Parrillo J.E., Dodek P., Wood G., Kumar A., Simon D., Peters C., Ahsan M., Chateau D. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*, 2009, vol. 136, no. 5, pp. 1237–1248. doi: 10.1378/chest.09-0087
25. Madrid L., Seale A.C., Kohli-Lynch M., Edmond K.M., Lawn J.E., Heath P.T., Madhi S.A., Baker C.J., Bartlett L., Cutland C., Gravett M.G., Margaret I., Doare K.L., Rubens C.E., Saha S.K., Meulen A.S., Vekemans J., Schrag S., the Infant GBS Disease Investigator Group. Infant group B streptococcal disease incidence and serotypes worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.*, 2017, vol. 65, no. suppl_2, pp. S160–S172. doi: 10.1093/cid/cix656
26. Mehmet M., Yılmaz G., Aslan Y., Bayramoğlu G. Risk Factors and clinical characteristics of Stenotrophomonas maltophilia infections in neonates. *J. Microbiol., Immunol. Infect.*, 2011, vol. 44, no. 6, pp. 467–472. doi: 10.1016/j.jmii.2011.04.014
27. Nam N.H., Bui Q.T.H. Assessing the appropriateness of antimicrobial therapy in patients with sepsis at a Vietnamese national hospital. *JAC Antimicrob. Resist.*, 2021, vol. 3, no. 2: dlab048. doi: 10.1093/jacamr/dlab048
28. Oo N.A.T., Edwards J.K., Pyakurel P., Thekkur P., Maung T.M., Aye N.S.S., Nwe H.M. Neonatal sepsis, antibiotic susceptibility pattern, and treatment outcomes among neonates treated in two tertiary care hospitals of Yangon, Myanmar from 2017 to 2019. *Trop. Med. Infect. Dis.*, 2021, vol. 6, no. 2: 62. doi: 10.3390/tropicalmed6020062
29. Panigrahi P., Chandel D.S., Hansen N.I., Sharma N., Kandfer S., Parida S., Satpathy R., Pradhan L., Mohapatra A., Mohapatra S.S., Misra P.R., Banaji N., Johnson J.A., Morris J.G.J., Gewolb I.H., Chaudhry R. Neonatal sepsis in rural India: timing, microbiology and antibiotic resistance in a population-based prospective study in the community setting. *J. Perinatol.*, 2017, vol. 37, no. 8, pp. 911–921. doi: 10.1038/jp.2017.67
30. Roland R.K., Mendes R.E., Silbert S., Bolsoni A.P., Sader H.S. In vitro antimicrobial activity of piperacillin/tazobactam in comparison with other broad-spectrum beta-lactams. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2000, vol. 4, no. 5, pp. 226–235
31. Salsabila K., Toha N.M.A., Rundjan L., Pattanittum P., Sirikarn P., Rohsiswatmo R., Wandita S., Hakimi M., Lumbiganon P., Green S., Turner T. Early-onset neonatal sepsis and antibiotic use in indonesia: a descriptive, cross-sectional study. *BMC Public Health.*, 2022, vol. 22, no. 1: 992. doi: 10.1186/s12889-022-13343-1
32. Sindhu S., Soraisham A.S., Swarnam K. Choice and duration of antimicrobial therapy for neonatal sepsis and meningitis. *Int. J. Pediatrics*, 2011, vol. 2011: 712150. doi: 10.1155/2011/712150
33. Sinh C.T., Loi C.B., Minh N.T.N.M., Lam N.N., Quang D.X., Quyet D., Anh D.N., Hien T.T.T.H., Su H.X., Tran-Anh L. Species distribution and antifungal susceptibility pattern of candida recovered from intensive care unit patients, Vietnam national hospital of burn (2017–2019). *Mycopathologia*, 2021, vol. 186, no. 4, pp. 543–551. doi: 10.1007/s11046-021-00569-7
34. Tam P.Y.I., Bendel C.M. Diagnostics for neonatal sepsis: current approaches and future directions. *Pediatric Res.*, 2017, vol. 82, no. 4, pp. 574–583. doi: 10.1038/pr.2017.134
35. Toan N.D., Darton T.C., Boinett C.J., Campbell J.I., Karkey A., Kestelyn E., Thinh L.Q., Mau N.K., Thanh Tam P.T., Nhan L.N.T., Quang Minh N.N., Phuong C.N., Hung N.T., Xuan N.M., Thuong T.C., Baker S. Clinical and laboratory factors associated with neonatal sepsis mortality at a major vietnamese children’s hospital. *PLoS Glob. Public Health*, 2022, vol. 524, no. 9: e0000875. doi: 10.1371/journal.pgph.0000875
36. Tran H.T., Doyle L.W., Lee K.J., Dang N.M., Graham S.M. A high burden of late-onset sepsis among newborns admitted to the largest neonatal unit in Central Vietnam. *J. Perinatol.*, 2015, vol. 35, no. 10, pp. 846–851. doi: 10.1038/jp.2015.78

37. Tran H.T., Doyle L.W., Lee K.J., Dang N.M., Graham S.M. Morbidity and mortality in hospitalised neonates in Central Vietnam. *Acta Paediatrica*, 2015, vol. 104, no. 5, pp. e200–e205 doi: 10.1111/apa.12960
38. Vergnano S., Sharland M., Kazembe P., Mwansambo C., Heath P.T. Neonatal sepsis: an international perspective. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal. Ed.*, 2005, vol. 90, no. 3, pp. F220–F224. doi: 10.1136/adc.2002.022863
39. Vu T.V.D., Choisy M., Do T.T.N., Nguyen V.M.H., Campbell J.I., Le T.H., Nguyen V.T., Wertheim H.F.L., Thach N.T., Nguyen V.K.H., Doorn R. & the VINARES consortium. Antimicrobial susceptibility testing results from 13 hospitals in Viet Nam: VINARES 2016–2017. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.*, 2021, vol. 10, no. 1: 78. doi: 10.1186/s13756-021-00937-4
40. Waters D., Jawad I., Ahmad A., Lukšić I., Nair H., Zgaga L., Theodoratou E., Rudan I., Zaidi A.K., Campbell H. Aetiology of community-acquired neonatal sepsis in low and middle income countries. *J. Glob. Health*, 2011, vol. 1, no. 2, pp. 154–170
41. World Health Organization. Global report on the epidemiology and burden of sepsis: current evidence, identifying gaps and future directions. 2020. Geneva.
42. World Health Organization. The selection and use of essential medicines: report of the WHO Expert Committee, 2017 (including the 20th WHO model list of essential medicines and the 6th model list of essential medicines for children). *World Health Organization*. 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
43. World Health Organization. WHO sepsis technical expert meeting, 16–17 January 2018. *World Health Organization*. 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
44. Wu J.H., Chen C.Y., Tsao P.N., Hsieh W.S., Chou H.C. Neonatal sepsis: a 6-year analysis in a neonatal care unit in Taiwan. *Pediatr. Neonatol.*, 2009, vol. 50, no. 3, pp. 88–95. doi: 10.1016/S1875-9572(09)60042-5
45. Zea-Vera A., Ochoa T.J. Challenges in the diagnosis and management of neonatal sepsis. *J. Trop. Pediatr.*, 2015, vol. 61, no. 1, pp. 1–13. doi: 10.1093/tropej/fmu079
46. Zelellw D.A., Dessie G., Mengesha E.W., Shiferaw M.B., Merhaba M.M., Emishaw S. A systemic review and meta-analysis of the leading pathogens causing neonatal sepsis in developing countries. *BioMed Res. Int.*, 2021, vol. 2021: 6626983. doi: 10.1155/2021/6626983

Авторы:

Тханг Ч.Т., к.м.н., Департамент медицинской экспертизы, Глазная больница Нге Ан, Нге Ан, Вьетнам;
Канх Х.Д., к.м.н., директор Национального института малярии, паразитологии и энтомологии, Ханой, Вьетнам;
Ту Н.Т.Н., магистр, врач, Международный медицинский центр, Национальная детская больница, Ханой, Вьетнам;
Тханг Т.Д., врач, отделение внутренних болезней, Больница Тхай Тхьонг Хоанг, Нге Ан, Вьетнам.;
Лан Л.Т.П., к.м.н., Департамент инспекции, Управление по контролю за продуктами питания Вьетнама, Министерство здравоохранения, Ханой, Вьетнам;
Лой К.Б., к.м.н., доцент, отдел научного менеджмента и обучения, Национальный институт малярии, паразитологии и энтомологии, Ханой, Вьетнам;
Ань Л.Ч., к.м.н., доцент, кафедра паразитологии, Вьетнамский военно-медицинский университет, Ханой, Вьетнам.

Authors:

Thang T.T., MD, PhD, Department of Medical examination, Nghe An Eye Hospital, Nghe An, Vietnam;
Canh H.D., MD, PhD, Director, National Institute of Malaria, Parasitology and Entomology, Ha Noi, Vietnam;
Tu N.T.N., MD, MA, International Medical Center, National Children's Hospital, Ha Noi, Vietnam;
Thang T.D., MD, Department of Internal medicine, Thai Thuong Hoang Hospital, Nghe An, Vietnam;
Lan L.T.P., MD, PhD, Department of Inspection, Vietnam Food Administration, Ministry of Health, Ha Noi, Vietnam;
Loi C.B., MD, PhD, Associate Professor, Scientific and Training Management Department, National Institute of Malaria, Parasitology and Entomology, Ha Noi, Vietnam;
Anh L.T., MD, PhD, Associate Professor, Department of Parasitology, Vietnam Military Medical University, Ha Noi, Vietnam.

Поступила в редакцию 22.11.2022
 Отправлена на доработку 04.07.2023
 Принята к печати 05.03.2024

Received 22.11.2022
 Revision received 04.07.2023
 Accepted 05.03.2024

GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF COVID-19 INFECTION ACROSS SAUDI ARABIA

H.M. Aldossari^a, A. Abdul Salam^b

^a Imam Mohammed Ibn Saud Islamic University, Riyadh, Saudi Arabia

^b Institute of Demographical Studies, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia

Abstract. *Background.* Saudi Arabia, a large country in terms of population size and geographical area, is divided into administrative areas and governorates. It has metropolises, cities (large, medium sized, and small), towns, villages and rural neighborhoods, classifiable into well equipped, rapidly expanding, and others. The COVID-19 epidemics spread all over the country with differentials in infection rates, percentages, and affected persons, alongside daily increases. This analysis, focused on administrative areas, aimed to comprehend the spread and escalation of the epidemic, in addition to highlighting the distribution of the infected population with a special emphasis on geographical spread and seasonal variations. *Materials and methods.* This analysis of data compiled from COVID-19 daily reports published by the Saudi Arabian Ministry of Health considers into account administrative areas and localities (neighborhoods) to demonstrate the distribution of spread, increase in infection, and the proportion of population infected between March 21, 2020 and May 4, 2023. *Results.* A large majority of the infected cases were reported in three major administrative areas including Riyadh, Makkah, and the Eastern Region. Other regions had a smaller number of infected cases. However, some locations, especially medium-sized upcoming towns and neighborhoods experienced greater number of people seriously affected at a rapid pace, with seasonal differentials, in medium sized upcoming cities — the governorate headquarters and promising future cities, apart from the major cities. *Conclusions.* COVID-19 spread in the country followed a certain regional pattern. Beyond the populous administrative areas, upcoming cities in fast changing areas had a high impact. Thus, having a categorization of major, medium or low spread is necessary. Such detailing of COVID-19 infection would be useful not only to develop combating strategies but also to create epidemic and emergency preparedness.

Key words: spread and increase, affected locations, contamination per 1000 persons, major cities, governorates and localities, seasonal variation.

ГЕОГРАФИЧЕСКОЕ РАСПРОСТРАНЕНИЕ ИНФЕКЦИИ COVID-19 В САУДОВСКОЙ АРАВИИ

Альдоссари Х.М.¹, Абдул Салам А.²

¹ Исламский университет имама Мухаммеда ибн Сауда, Эр-Рияд, Саудовская Аравия

² Институт демографических исследований, Университет короля Сауда, Эр-Рияд, Саудовская Аравия

Резюме. *Введение.* Саудовская Аравия, крупная по численности населения и территории страна, разделена на административные районы и провинции, в состав которых входят мегаполисы, города (большие, средние и малые), поселки, деревни и сельские кварталы с разным уровнем развития инфраструктуры, темпом экономического роста и пр. Эпидемия COVID-19 распространилась по всей стране, но с региональными различиями в уровнях заражения, процентах и количестве пострадавших, показателях ежедневного прироста числа забо-

Адрес для переписки:

Хамад Мансур Альдоссари
Тел.: 00966554245300.
E-mail: hmaldossari@imamu.edu.sa; hmd5300@yahoo.com

Contacts:

Hamad Mansur Aldossar
Phone: 00966554245300.
E-mail: hmaldossari@imamu.edu.sa; hmd5300@yahoo.com

Для цитирования:

Альдоссари Х.М., Абдул Салам А. Географическое распространение инфекции COVID-19 в Саудовской Аравии // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 141–154. doi: 10.15789/2220-7619-GDO-17532

Citation:

Aldossari H.M., Abdul Salam A. Geographical distribution of COVID-19 infection across Saudi Arabia // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 141–154. doi: 10.15789/2220-7619-GDO-17532

This manuscript has been funded by The Deanship of Scientific Research at Imam Mohammad Ibn Saud Islamic University, Riyadh, through the Research Grant No. IMSIU-RG23162.

левших. Настоящий анализ ситуации с COVID-19 на разных административных территориях страны был проведен с целью выявления факторов распространения эпидемии и распределения инфицированного населения в зависимости от географического положения региона и присущих ему сезонных климатических колебаний. *Материалы и методы.* Были проанализированы данные о распределении заболеваемости, росте заражения и доле населения, инфицированного в период с 21 марта 2020 г. по 4 мая 2023 г., на различных административных территориях и населенных пунктах (районах) страны, полученные из ежедневных отчетов о COVID-19, опубликованных Министерством здравоохранения Саудовской Аравии. *Результаты.* Подавляющее большинство случаев заражения было зарегистрировано в трех основных административных районах, включая Эр-Рияд, Мекку и Восточный регион. В других регионах число зараженных было меньше. Тем не менее большое количество людей серьезно пострадало от быстрого темпа распространения заболевания, особенно в крупных и развивающихся городах, в крупных жилых и коммерческих районах, кварталах среднего размера. *Выводы.* Распространение COVID-19 в стране имело определенную региональную закономерность. Помимо густонаселенных административных районов, большое влияние на этот показатель оказали города в быстроразвивающихся регионах. Были выделены административные районы с большим, средним и низким уровнем распространения COVID-19. Такая классификация будет полезной не только для разработки стратегий борьбы, но и для обеспечения готовности к эпидемиям и чрезвычайным ситуациям в будущем.

Ключевые слова: распространение и рост, затронутые территории, инфицированность на 1000 человек, крупные города, провинции и населенные пункты, сезонные колебания.

Introduction

Saudi Arabia is a large country in terms of geographical area and is divided into 13 administrative areas and 151 governorates. The country borders five Arabian Gulf countries and a few other Arab nations, boasting a wide coastal area to the east and west. Despite accommodating a vast population, both native and foreign, the country maintains a low population density, mainly because of uninhabited desert areas. Developmental efforts focused on constructing infrastructure — residential, commercial, educational, and medical — in various parts of the country have created many urban areas. Consequently, populations have migrated to these areas seeking improved lifestyles, livelihoods, and professional opportunities [23]. In summary, many cities and towns in Saudi Arabia have high population concentrations. This situation expedites the potential for faster infection rates in the country [6, 21, 22].

Saudi Arabia has grappled with a rapid spread of COVID-19 in various overpopulated areas characterized by a transient population, despite efforts to contain, isolate, enforce social distancing, and impose lockdowns. In addition, the country implemented several strategies, such as the suspension of religious, entertainment, and sporting mass gatherings; temporary closure of educational establishments; and the postponement of all non-essential gatherings by imposing a complete curfew implemented even before confirming the first case [4, 5, 8, 11, 16, 20, 23]. COVID-19, recognized as a new strain of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, plagued the Middle East, with the majority of cases reported in Saudi Arabia. The country also experienced a higher case fatality rate [12, 20].

The global pandemic reported its first case on March 2, 2020, in Saudi Arabia and has been resisted through various strategic interventions. Saudi

Arabia has been appraised for its mitigation measures (a combination of Chinese and German technologies) characterized by swift community action and hospital preparedness. These efforts have been made in the absence of experimental studies on treatment options, economic impact assessments, and epidemiological studies [3, 6, 7, 9, 13, 15, 20]. This endeavor could be aligned with the 2030 Vision, which aims to position the country as a business and tourism hub, aiming for well-developed herd immunity [2, 23].

Considering the diverse geography of the country and the heterogeneity of its population in terms of living arrangements, population density, and livelihoods reflected in varying sex ratios, child population, geographical condition, environmental situation, and the availability of resources, such as hospitals and medical facilities [14], this study aimed to conduct a spatial analysis of COVID-19. Hence, disparities across cities and neighborhoods, in addition to the administrative areas of the country, were important in understanding risk factors, immune responses, treatment effectiveness, and mortality rate. This spatial analysis, focused on administrative areas, aimed to comprehend the spread and escalation of the epidemic, in addition to highlighting the distribution of the infected population with a special emphasis on geographical spread and seasonal variations.

Materials and methods

This analysis was based solely on daily reports of COVID-19 cases published by the Ministry of Health of Saudi Arabia (<https://sehhty.com>), which is referred to by Alanezi et al. (2020) as the most reliable source of information. Reports from March 21, 2020, to May 4, 2023, were compiled on an Excel worksheet for consolidated illustrations and analyses.

A trend of daily infections across administrative areas was plotted.

Majorly affected locations within each administrative area were plotted.

An increase in infection rates was calculated for each administrative area, specifically focusing on the major affected locations.

The number of infected cases per 1000 individuals based on available population data in 2020, 2021, and 2022 for administrative areas was determined.

Population sizes for administrative areas in 2020, 2021, and 2022 were used to calculate the infection rate per 1000 individuals. However, population data for localities within each administrative area was only available for 2022.

Results

Saudi Arabia has been substantially impacted by COVID-19 (SARS-CoV-2). The infection initially spread through travelers from Iran to the Eastern Region via neighboring Bahrain and Kuwait. A few cases in Al-Qatif City disseminated to other parts of the province and thereafter extended to additional provinces and neighborhoods, such as Makkah, Jeddah, Al-Madina, and Riyadh. On March 21, 2020, the Ministry of Health commenced daily online data uploads, recording a total of 392 infected individuals. The infection rate swiftly escalated to 1453 by March 31, 2020, and reached 840 435 by May 4, 2023. This indicates a rapid spread, especially during June–July 2020, reporting approximately 5000 new cases per day, and later during January–February 2022. The spread during June–July is referred to as the first wave, while that during January–February is referred to as the second wave, with random surges in the second quarter of 2021.

Spread in the administrative areas

Several governorates in Saudi Arabia were affected with varying intensities. Metropolises with a large transient population, emerging cities with a dense population, and areas with a high-proportion of expatriates, were more affected than others (Fig. 1). For example, by May 4, 2023, Riyadh, Makkah, and the Eastern Region administrative areas were affected more than the others with 231 547, 206 004, and 164 006 affected individuals, respectively, accounting for approximately 71% of the total cases. Al-Jouf and the Northern Borders had 3974 and 7038 infected individuals, respectively, marking the two administrative areas with the lowest infection rates (Fig. 1). Another region exhibiting lower spread was Al-Baha, with 11 143 reported cases.

Affected locations in each administrative area

Certain governorates and cities, recognized as major commercial, educational, residential, and developmental zones hosting migrants, reported a higher number of cases. Figure 2 (see color plate) illustrates these geographical clusters by percentage

for each quarter annually. For example, in the Riyadh administrative area, Al-Kharj, Riyadh, and Wadi Ad Dawasir emerged as major affected areas: key economic, commercial, and educational centers. These locations exhibited higher infection rates, but with seasonal variations. The overall infection rate displayed peak periods in the second quarter (Q2 2020; April–June) and Q1 2022 (January–March). Riyadh City recorded peak infections in Q1 2022, followed by Q2 2020. Al-Kharj had the highest infection rate in Q1 2022, followed by Q2 2020 and Q3 2020. Wadi Ad Dawasir followed a different trend, with its highest infection rate in Q3 2020, followed by Q2 2021. The overall infection rate in this administrative area largely depended on Riyadh City. In contrast, the Makkah administrative area had high infection rates in Jeddah, Makkah City, and Taif. Makkah City experienced a substantial surge during Q2 2020, followed by Q1 2022, and Q3 2020. Jeddah showed a different pattern, with its highest infection rate was in Q2 2020 and Q1 2022, while Taif recorded peak infections during Q2 2020 and Q3 2020. Other locations in this region recorded elevated infection rates in Q1 2022. In contrast, the Al-Madina administrative area experienced a gradual spread: Al-Madina City showed substantial spread during Q2 2020; Al-Ula initially had a lower spread but reached its highest during Q1 2022; and Yanbu had a gradual spread, with the highest in Q3 2020 and Q3 2021.

The three majorly affected localities in the Eastern Region were Ad Dammam, Al-Hufuf, and Al-Khubar, with heavy infections occurring during Q2 2020 (very high in Al-Khubar) and Q1 2022. Al-Qasim showed a different pattern: Q2 2020 was less serious, but Q3 had a wider spread, especially in Buraydah and its smaller localities. Q1 2022 also recorded higher levels, particularly in Ar Rass, whereas Unayzah recorded a smaller spread. Hail administrative areas recorded heavy infections in Ash Shinan, Baqa, and Hail City. None exhibited high levels in Q2 2020 but Ash Shinan reported high levels in Q2 2021, while Baqa and Hail City experienced elevated infections in Q3 2020. Additionally, smaller geographic clusters indicated significant infection rates in Q3 2020, Q2 2021, Q3 2021, and Q1 2022. Aseer had a more limited spread, except in Q3 2020 in Khamis Mushayt, Muhayil, and other smaller locations. However, Q1 2022 saw a serious spread in Muhayil and Abha, but not in Khamis Mushayt. In the Jazan administrative area, a comparatively uniform spread was recorded in Abu Arish, Baysh, Jazan City, and other smaller locations, with high infection rates during Q3 2020 and Q1 2022. Baysh experienced serious infections only in Q2 2020.

Hubuna, Najran City, and Sharorah were the most affected localities in the Najran administrative area. None of them had a high spread during Q2 2020. Hubuna recorded a high spread in Q2 2021 and Q3 2021, and Najran City and Sharorah recorded a high

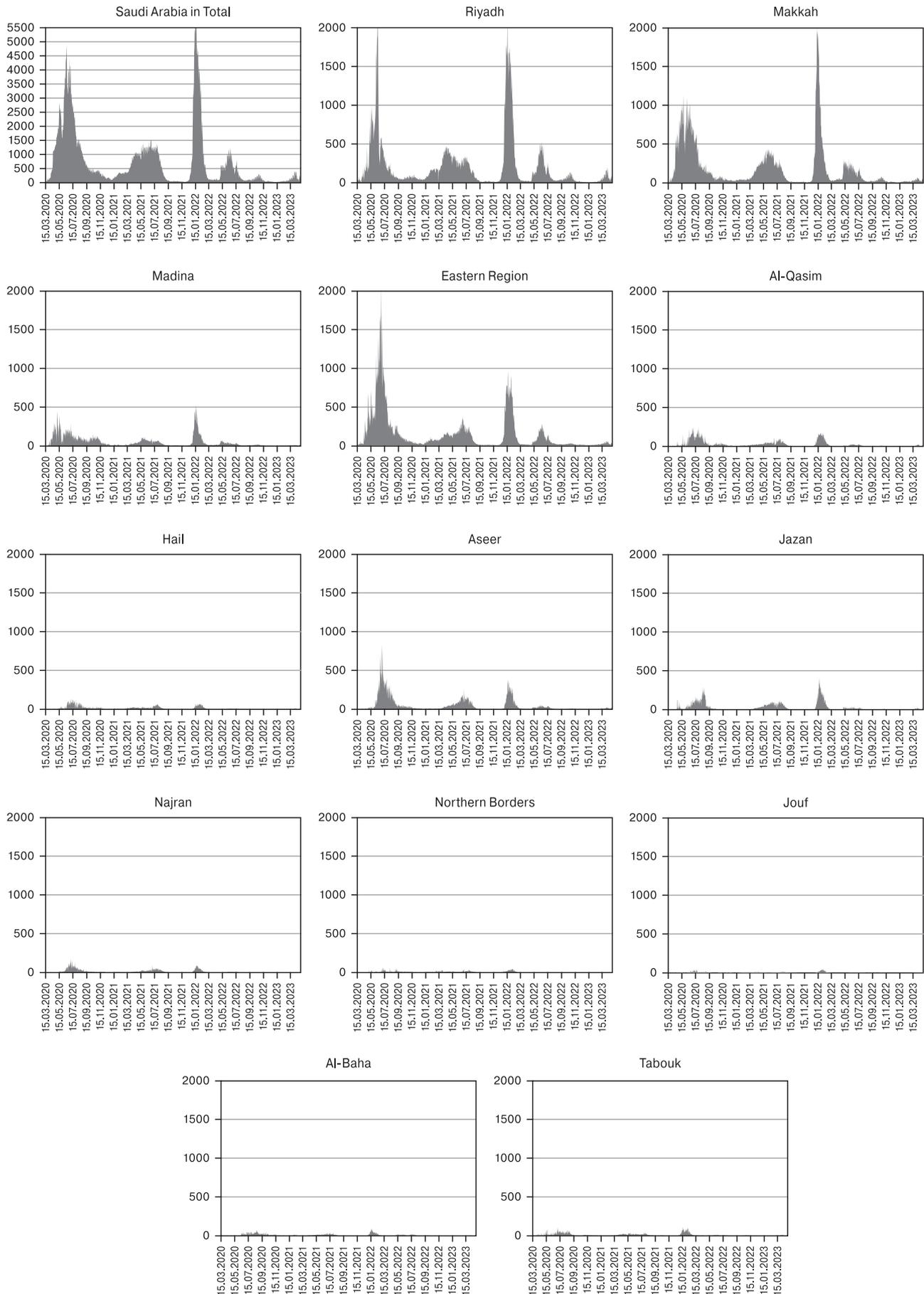


Figure 1. COVID-19 daily infections in Saudi Arabia and its 13 administrative areas

spread in Q3 2020. Other smaller geographic divisions/townships recorded a gradual spread. In the Northern Borders administrative area, Arar, Rafha, Turayf, and other smaller townships recorded a spread. Arar experienced high spread during Q3 2020, Q2 2021, and Q1 2022; Rafha followed a similar pattern but in Q3 2021 instead of Q2 2021; Turayf showed high spread during Q1 2021 and Q1 2022. In the Al-Jouf administrative area, Al-Qurayyat, Sakaka, Tubarjal, and other smaller townships were affected. The highest spread occurred during Q3 2020 and Q1 2022 in Al-Qurayyat and Sakaka, Q3 2021 and Q2 2022 in Tubarjal, and Q1 2022 in other smaller units. In the Al-Baha administrative area, Al-Baha City experienced serious impact in Q1 2022, Al-Mukhwah in Q3 2020 and Q1 2022, and Biljurashi in Q3 2020 and Q2 2021. Other smaller locations, exhibited the widest spread during Q3 2020 and Q1 2022. Within the Tabouk administrative area, Duba (Q1 2022), Tabouk City (Q3 2020), and Umluj (Q2 2021 and Q3 2021) were the most affected areas, showing seasonal variations. Other smaller locations in the area experienced major infections in Q1 2022.

The number of locations affected in each administrative area varied: Riyadh (33), Makkah (29), Al-Madina (11), the Eastern Region (27), Al-Qasim (14), Hail (9), Aseer (25), Jazan (17), Najran (7), the Northern Borders (8), Al-Jouf (8), Al-Baha (9), and Tabouk (8), constituting a total of 205 localities.

Increase in infection

This section aims to explain the pattern of COVID-19 spread, highlighting the major affected localities. It was found that cases of infection increased significantly, from a mere 392 cases on March 21 (193 899 in Q2 2020, including 10 days in March) to 847 219 in Q2 2023 (April and 4 days in May). This represented a 4.4 times increase with seasonal, monthly, and quarterly variations (Table 1). This increase on a daily basis was traced across quarters-seasons: cases increased by 1.7 (334 690), 1.9 (362 652), 2.0 (390 325), 2.5 (488 499), 2.8 (546 599), 2.9 (556 868), 3.9 (750 564), 4.1 (795 593), 4.2 (816 373), 4.3 (826 686), and 4.3 (833 527) times, quarter-wise, recording the highest increases during Q1 2022 (1.0 points from 2.9 to 3.9), followed by Q2 2021 (0.5 points from 2.0 to 2.5), and recording a fractional increase except in Q3 2021 (0.3 point increase).

The Riyadh administrative area, housing the national capital, initially recorded 52 909 cases (Q2 2020), which saw a gradual increase until Q1 2021, followed by a rise of 0.6 points. Subsequently, in Q1 2022, it surged by 1.3 points, displaying a slow but consistent upward trend. By Q2 2023, this administrative area reported a total of 231 547 cases. Numerous localities within this area were affected, notably Ad Duwadimi (77–2079; 27 times), Ad Dilam (956–5387; 19.2 times), and Afif (1371–1979; 17.0 times). While these increases followed a different pattern, Ad Duwadimi witnessed the fastest rise, particularly during Q1 2022

(an increase from 1705 to 1880; 175 cases) and Q2 2021 (from 1572 to 1656; 84 cases). However, the number of cases in Ad Dilam rapidly increased during Q1 2021 and Q2 2021 (from 2040 to 2528, an increase of 488; and to 3072, an increase of 544), marking rises of 4.5 and 4.4 points, respectively. In Afif, the increase was less rapid (from 1371 to 1979 cases), with the most rapid rise observed during Q2 2021 (from 1572 to 1656 cases), marking an increase of 3.4 points. All other localities, including Riyadh, recorded nominal increases except during Q1 2021 and Q2 2021.

In the Makkah administrative area, there were 57 389 cases in Q2 2020, which increased rapidly in the next quarter (0.5 points) and thereafter progressed slowly until Q1 2021. It saw a rise of 0.5 points in Q1 2021 and 0.9 points in Q1 2022, with a gradual but consistent increase to 206 004 by Q2 2023. The majorly affected localities include Al-Kamil (31–1768; 57 times), Al-Lith (100–3869; 38.7 times), and Rabigh (5537–23 032; 18.8 times). While these increases showed different patterns, Al-Kamil's rise was considered the fastest, particularly during Q3 2020 (an increase from 31 to 261; 230 cases), Q2 2021, and Q3 2021 (362–840, an increase of 478 cases, and to 1170 cases, an increase of 330 cases, respectively), and Q1 2022 (1180–1741; 561 cases). In contrast, cases in Rabigh recorded rapid increases only in Q1 2022 (16 956–20 408; 3452 cases), registering a 13.9-point surge. All other localities, including Jeddah and Makkah, recorded nominal increases, except in Q1 2022, although Makkah and Al-Qunfudhah did not.

In the Al-Madina administrative area, there were 15 106 cases in the beginning quarter (Q2 2020), which increased quickly over the next two quarters (0.6 and 0.4 points), and thereafter proceeded slowly until Q4 2021, raised by 0.7 points. In Q1 2022, it reporting slow but steady increases, reaching 56 872 by Q2 2023. Localities notably affected at a rapid pace include Al-Ula (35–1699; 48.5 times), Khaybar (24–1384; 57.7 times), Al-Mahd (95–1125; 11.8 times), and Yanbu (947–11 305; 11.9 times). While these increases showed different patterns, Khaybar witnessed the fastest rise. Initially low in Q2 2020, it surged notably in Q3 2020 and Q4 2020 (from 24 to 275, an increase of 251 cases; and to 398, an increase of 123 cases, respectively), followed by Q2 2021 and Q3 2021 (from 434 to 640, an increase of 206 cases; and to 850, an increase of 210 cases, respectively), and Q1 2022 (from 852 to 1339, an increase of 487 cases). However, the number of cases at Al-Mahd (most rapid in Q1 2022) and Yanbu increased slowly (from 95 to 1125 and from 947 to 11 305, respectively). Al-Madina recorded a gradual increase, whereas other localities experienced swift spreading, especially in Q2 2021 and Q1 2022.

In the Al-Qasim administrative area, there were 3759 cases in the first quarter, which rapidly increased in the next quarter (2.2 points) and continued to rise in Q1 2021 and Q2 2021 (0.9 points each) and Q1 2022 (1.7 points), reporting slow but steady increases.

Table 1. Increase of COVID-19 reported cases from the base as unity by administrative areas

Region/Location	2020			2021				2022				2023	
	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2
Riyadh													
Ad Diriyah	1.0	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
Afif	1.0	4.8	5.8	6.7	10.1	12.3	12.4	15.2	16.0	16.4	16.8	16.8	17.0
Ad Duwadimi	1.0	5.5	6.5	8.3	12.8	14.5	14.8	22.4	24.2	25.2	25.8	26.3	27.0
Ad Dilam	1.0	3.1	4.7	9.2	13.6	15.0	15.0	18.2	18.8	18.9	19.1	19.1	19.2
Al-Kharj	1.0	1.9	2.1	2.6	3.2	3.4	3.5	4.9	5.3	5.5	5.5	5.6	5.6
Al-Majmaah	1.0	2.3	3.3	4.0	5.0	5.5	5.6	6.8	7.0	7.1	7.2	7.2	7.2
Hawtat Bani Tamim	1.0	2.3	2.6	3.4	4.7	5.1	5.1	6.2	6.5	6.6	6.6	6.6	6.6
Riyadh	1.0	1.2	1.3	1.5	2.0	2.2	2.3	3.6	3.9	4.0	4.1	4.1	4.2
Wadi Ad Dawasir	1.0	2.5	3.0	3.5	4.5	5.2	5.2	5.7	5.9	6.0	6.1	6.2	6.2
Rest of Riyadh	1.0	2.2	2.5	3.1	3.8	4.4	4.5	5.7	5.9	6.0	6.1	6.1	6.1
Total	1.0	1.3	1.4	1.6	2.2	2.5	2.5	3.8	4.1	4.2	4.3	4.3	4.4
Makkah													
Al-Kamil	1.0	8.4	10.4	11.7	27.1	37.7	38.1	56.2	57.0	57.0	57.0	57.0	57.0
Al-Lith	1.0	6.2	6.8	9	21.2	23.3	23.6	38.3	38.6	38.7	38.7	38.7	38.7
Jeddah	1.0	1.3	1.4	1.5	1.9	2.1	2.2	3.2	3.5	3.6	3.7	3.8	3.8
Khulays	1.0	2.6	2.9	3.0	3.5	3.6	3.7	8.6	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7
Makkah	1.0	1.3	1.4	1.5	1.7	1.8	1.9	2.3	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Al-Qunfudhah	1.0	4.4	4.7	5.0	7.2	8.3	8.4	9.7	9.9	9.9	10.0	10.0	10.0
Rabigh	1.0	2.0	2.0	2.2	3.0	3.6	4.0	18.1	18.7	18.8	18.8	18.8	18.8
Taif	1.0	2.0	2.0	2.1	2.6	3.0	3.1	3.7	3.9	4.0	4.1	4.1	4.2
Rest of Makkah	1.0	3.0	3.3	3.5	5.2	6.0	6.1	9.0	9.3	9.4	9.4	9.4	9.4
Total	1.0	1.5	1.5	1.6	2.1	2.3	2.3	3.2	3.4	3.5	3.5	3.6	3.6
Al-Madina													
Al-Ula	1.0	6.9	8.7	9.3	12.7	21.6	22.4	45.1	47.1	48	48.3	48.4	48.5
Khaybar	1.0	11.5	16.6	18.1	26.7	35.4	35.5	55.8	57.2	57.5	57.6	57.6	57.7
Al-Mahd	1.0	3.9	5.2	5.9	6.7	7.0	7.2	11.6	11.7	11.8	11.8	11.8	11.8
Yanbu	1.0	3.6	5.4	5.8	8.4	9.4	9.5	11.5	11.7	11.8	11.9	11.9	11.9
Al-Madina	1.0	1.4	1.6	1.7	1.8	1.9	1.9	2.4	2.5	2.6	2.7	2.7	2.7
Rest of Al-Madina	1.0	3.9	6.2	6.7	12.5	17.4	18.4	26.6	27.2	27.6	27.7	27.7	27.7
Total	1.0	1.6	2.0	2.0	2.4	2.6	2.7	3.4	3.6	3.7	3.7	3.7	3.8
Al-Qasim													
Al-Badai	1.0	5.0	5.9	6.3	8.4	11.1	11.2	14.9	15.2	15.3	15.3	15.3	15.4
Al-Midhnab	1.0	5.0	5.9	6.3	7.5	9.2	9.2	11.0	11.1	11.1	11.1	11.1	11.2
Ar Rass	1.0	3.2	3.3	3.4	3.6	3.8	3.9	7.2	7.6	8.0	8.2	8.3	8.5
Buraydah	1.0	2.5	2.8	2.9	3.3	3.8	3.9	4.8	5.0	5.2	5.3	5.3	5.4
Riyadh Al-Khabra	1.0	6.5	8.5	8.9	12.3	15.6	15.7	19.3	19.3	19.3	19.3	19.3	19.3
Unayzah	1.0	3.6	4.2	4.5	5.6	6.8	6.9	8.8	9.2	9.5	9.6	9.7	9.9
Rest of Al-Qasim	1.0	4.3	5.3	5.7	7.5	9.3	9.4	11.3	11.5	11.6	11.6	11.6	11.6
Total	1.0	3.2	3.7	3.9	4.8	5.7	5.7	7.4	7.6	7.8	7.8	7.9	8.0
Eastern Region													
Al-Jubayl	1.0	1.3	1.4	1.5	1.7	2.0	2.0	2.4	2.4	2.5	2.5	2.5	2.5
Al-Khafji	1.0	3.5	4.1	5.2	9.1	12.1	12.2	15.7	16.1	16.3	16.4	16.5	16.6
Al-Mubarraz	1.0	2.9	3.0	3.2	3.8	4.1	4.1	4.7	4.7	4.8	4.8	4.8	4.8
Al-Nuayriyah	1.0	4.0	4.8	5.2	9.0	10.4	10.4	12.1	12.2	12.2	12.2	12.2	12.2
Buqayq	1.0	2.8	3.0	3.6	4.7	5.3	5.3	6.1	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
Ad Dammam	1.0	1.5	1.6	1.7	1.9	2.0	2.1	2.7	3.1	3.2	3.2	3.3	3.3
Adh Dhahran	1.0	1.8	2.0	2.2	2.7	3.1	3.1	3.8	4.1	4.3	4.3	4.4	4.5
Hafar Al-Batin	1.0	3.5	3.6	3.6	4.0	4.6	4.6	5.7	5.7	5.8	5.8	5.8	5.9
Al-Hufuf	1.0	1.7	1.8	1.9	2.1	2.2	2.2	2.8	3.0	3.0	3.0	3.0	3.1
Al-Khubar	1.0	1.3	1.4	1.4	1.6	1.8	1.8	2.4	2.5	2.5	2.5	2.6	2.6
Al-Qatif	1.0	1.5	1.6	1.7	1.7	1.8	1.9	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.4

Region/Location	2020			2021				2022				2023	
	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2
Eastern Region													
Ras Tannurah	1.0	1.9	2.0	2.1	2.2	2.4	2.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4
Safwa	1.0	1.5	1.5	1.5	1.7	1.9	1.9	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
Rest of Eastern Region	1.0	2.7	3.0	3.4	4.6	5.4	5.4	6.9	7.0	7.0	7.1	7.1	7.1
Total	1.0	1.7	1.8	1.9	2.2	2.4	2.5	3.1	3.3	3.3	3.4	3.4	3.4
Aseer													
Abha	1.0	2.6	2.8	2.9	3.6	4.5	4.5	6.3	6.9	7.1	7.2	7.3	7.3
Ahad Rufaydah	1.0	3.3	3.5	3.5	3.9	4.3	4.3	5.6	5.8	5.8	5.9	5.9	6.0
Ballasmar	1.0	10.5	13.3	14	21.7	31.2	31.3	33.5	34.1	34.7	34.7	34.7	34.9
Bishah	1.0	2.5	2.6	2.7	3.3	3.7	3.7	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.6
Zahran Al-Janub	1.0	5.5	6.6	7.0	11.5	13.8	13.9	16.5	16.8	16.9	16.9	17	17.1
Khamis Mushayt	1.0	2.6	2.8	2.9	3.4	3.8	3.8	4.3	4.4	4.4	4.5	4.5	4.5
Muhayil	1.0	2.5	2.7	2.7	3.2	3.6	3.6	5.1	5.3	5.3	5.4	5.4	5.5
Rijal Al-Ma	1.0	8.5	10.0	10.2	12.7	15.4	15.5	18.9	19.1	19.2	19.2	19.2	19.2
Sarat Abidah	1.0	6.2	6.9	7.0	7.4	7.6	7.6	15.3	16.3	16.9	17.5	18.2	19.0
Rest of Aseer	1.0	5.5	5.7	5.8	6.9	7.8	7.8	9.3	9.4	9.5	9.5	9.5	9.5
Total	1.0	3.3	3.5	3.6	4.4	5.2	5.2	6.5	6.7	6.8	6.9	6.9	7.0
Tabouk													
Tabouk	1.0	2.8	3.0	3.2	4.0	4.4	4.5	5.7	5.9	6.0	6.2	6.3	6.4
Rest of Tabouk	1.0	4.4	5.1	5.5	8.7	11.8	12.3	19.9	20.6	20.8	20.9	20.9	21.0
Total	1.0	3.0	3.3	3.5	4.6	5.4	5.5	7.5	7.8	7.9	8.1	8.2	8.3
Hai													
Hail	1.0	2.6	4.2	4.5	4.8	6.0	6.1	7.1	7.3	7.4	7.5	7.5	7.6
Rest of Hail	1.0	6.9	8.8	10.1	14.9	20.9	21	27.2	27.3	27.4	27.4	27.4	27.4
Total	1.0	2.9	4.5	4.9	5.7	7.2	7.3	8.8	8.9	9.1	9.1	9.1	9.2
Northern Borders													
Arar	1.0	5.8	7.2	9.3	12.9	15.8	16.1	20.1	20.5	21.0	21.0	21.1	21.3
Rafha	1.0	6.5	7.8	9.4	10.6	16.3	16.5	20.9	21.0	21.1	21.1	21.1	21.1
Rest of Northern Borders	1.0	2.6	3.3	4.9	5.5	6.2	6.3	8.4	8.4	8.5	8.5	8.5	8.5
Total	1.0	4.7	5.8	7.6	9.7	12.2	12.4	15.7	15.9	16.2	16.2	16.2	16.3
Jazan													
Abu Arish	1.0	10.2	10.4	10.8	16.8	22.3	22.4	30.2	31.3	31.7	32	32.4	32.9
Baysh	1.0	2.2	2.2	2.2	2.5	2.7	2.7	3.9	4.0	4.0	4.1	4.1	4.1
Jazan	1.0	7.5	8.2	8.4	10.5	12.8	13	20.3	21.6	22.4	22.9	23.4	23.8
Sabya	1.0	5.3	5.4	5.5	7.2	8.3	8.4	13.0	13.8	14.0	14.0	14	14.1
Samtah	1.0	6.5	6.6	6.8	8.5	9.8	9.9	13.6	14.1	14.4	14.6	14.7	15.0
Rest of Jazan	1.0	6.5	6.7	7.0	11.8	15.9	16	21.4	21.8	22.1	22.1	22.2	22.3
Total	1.0	4.9	5.1	5.2	7.1	8.8	8.9	12.7	13.2	13.5	13.6	13.7	13.9
Najran													
Najran	1.0	3.3	3.7	3.9	4.7	5.6	5.7	6.7	6.9	7.1	7.2	7.2	7.3
Sharorah	1.0	3.8	3.9	4.1	4.6	5.3	5.3	6.6	6.7	6.8	6.8	6.8	6.8
Rest of Najran	1.0	5.8	6.7	7.3	11.8	18.8	18.9	25.2	25.3	25.5	25.6	25.6	25.7
Total	1.0	3.6	3.9	4.2	5.1	6.5	6.5	8.0	8.1	8.3	8.4	8.4	8.5
Al-Baha													
Al-Baha	1.0	2.1	2.4	2.7	3.3	4.8	8.1	8.1	9.7	11.3	11.8	12.3	12.6
Al-Mukhwah	1.0	4.5	6.2	6.4	7.6	8.3	10.8	10.8	11.3	11.5	11.5	11.6	11.6
Biljurashi	1.0	9.5	11.6	12.8	19.7	23.6	27.0	27.0	28.3	29.3	29.5	29.7	30.1
Rest of Al-Baha	1.0	7.5	9.2	9.9	10.6	11.7	15.3	15.3	15.8	16.3	16.3	16.3	16.5
Total	1.0	5.3	6.6	7.1	8.9	10.5	13.7	13.7	14.7	15.7	15.9	16.1	16.3
Al-Jouf													
Sakaka	1.0	5.6	6.1	7.5	11.1	11.1	11.1	15.5	15.8	16.2	16.3	16.4	16.7
Rest of Al-Jouf	1.0	3.4	4.5	6.1	10.8	10.8	10.8	15.1	15.2	15.4	15.4	15.4	15.4
Total	1.0	4.4	5.2	6.8	10.9	10.9	10.9	15.3	15.5	15.8	15.8	15.9	16.0
Country Total	1.0	1.7	1.9	2.0	2.5	2.8	2.9	3.9	4.1	4.2	4.3	4.3	4.4

This number reached 29 347 by Q2 2023. Affected localities included Al-Badai (98–1507; 15.4 times), Al-Midhnab (161–1801; 11.2 times), Riyadh Al-Khabra (77–1489; 19.3 times), and others (507–5904; 11.6 times). Although these increases followed different patterns, neither Al-Badai nor Al-Midhnab showed rapid seasonal increases, while Riyadh Al-Khabra did experience such rises in Q3 2021 and Q1 2022. While Buraydah recorded a slow increase, other localities witnessed a rapid spread, especially in Q1 2022.

In the Eastern Region, where this epidemic first emerged in the country, there were 48 305 cases initially. It swiftly spread, expanding to a large population in the next quarter (83 999 with a gap of 35 694, resulting in a 0.7 points increase), followed by another rise in Q1 2022 (0.6 points). A gradual but consistent increase was reported, reaching 164 006 by Q2 2023. Localities substantially and rapidly affected included Al-Khafji (208–3456; 16.6 times) and Al-Mubarraz (2728–13 068; 4.8 times). Despite following a similar pattern, a rapid increase was recorded during Q2 2021 and Al-Khafji had a second season of rapid increase during Q3 2021 (3.9 and 3.8 points, respectively). Major cities, such as Ad Dammam, Al-Khubar, and Al-Jubayl, recorded slow increases.

The Aseer administrative area initially recorded a reasonably high spread of 7972 in Q2 2020, which gradually increased to 55 573 by Q2 2023. The widely affected localities were Ballasmar (86–2999; 34.9 times), Zahran Al-Janub (102–1740; 17.1 times), Rijal Al-Ma (91–1751; 19.2 times), and Sarat Abidah (102–1934; 19.0 times). While these increases followed different patterns, Ballasmar's and Rijal Al-Ma's increases were comparable to those of Zahran Al-Janub and Sarat Abidah.

The Tabouk administrative area was a less affected geographical area, with a smaller spread of 1537 cases in Q2 2020, which slowly increased to 12 751 by Q2 2023. Localities in this administrative area were less widely affected, except Tabouk (1338–8568; 6.4 times). While the increase was slow, there was a relatively high spread during Q2 2020. Other localities in the area had a relatively low spread in the first quarter, notably expanding from 199 to 4183, marking a 21-time increase.

Similarly, the Hail administrative area followed a comparable pattern, recording a smaller spread of 1615 cases in Q2 2020, which gradually increased to 143 949 by May 4, 2023. Localities in this administrative area were less widely affected, except for Hail (1484–11 293; 7.6 times). While this increase was slow, there was a relatively high spread in Q2 2020, which recorded a slow but steady increase. Other localities witnessed a low spread in the first quarter but a rapid spread in the next one (Q3 2020), and thereafter in Q2 2021, Q3 2021, and Q1 2022. This was relatively widespread.

The Northern Borders administrative area followed a pattern very similar to that of Tabouk and

Hail areas, recording a smaller spread: 431 cases in Q2 2020, which increased slowly to 7038 by Q2 2023. Localities in this administrative area were less widely affected except the headquarters Arar (208–4422; 21.3 times) and Rafha (57–1201; 21.1 times), where the initial slow spread expanded in Q3 2020, Q2/Q3 2021, and Q1 2022. Other localities in the area witnessed a low spread in the first quarter that was maintained throughout by containment measures.

Jazan had a different pattern of spread, and most of the major locations were widely affected: 2393 cases in Q2 2020 increased rapidly to 33 286 by Q2 2023, marking Q3 2020 (to 11 651; 4.9 points) and Q1 2022 (from 21 188 to 30 318; 3.8 points) as the rapid increase seasons. Widely affected localities in this administrative area were the headquarters Jazan (437–10 399; 23.8 points) and others, such as Abu Arish (142–4674; 32.9 points), Baysh (1056–4364; 4.9 points), Sabya (232–3268; 14.1 points), and Samtah (155–2324; 15.0 points). Out of these, the largest city/governorate, Jazan, had the smallest spread, with a rapid spread at two points, in Q3 2020 (to 3294; 7.5 points) and Q1 2022 (from 5695 to 8858; 7.0 points), whereas the other specified towns had different patterns. The rest of Jazan, comprising small towns, witnessed a rapid and wide increase in COVID-19, by 22.3 times, with Q3 2020, Q2 2021, and Q1 2022 as the seasons of rapid increase.

The Najran administrative area had a lesser spread, unlike Jazan: 1651 cases in Q2 2020 increased slowly to 13 957 by Q2 2023, indicating no sharp increase or seasonal spread. Najran (1208–8799; 7.3 times) and Sharorah (329–2231; 6.8 times) were the two widely affected localities, with no widespread, not even seasonal variations. The rest of Najran, comprising small towns and neighborhoods, recorded a rapid spread from a mere 114 to 2927 cases, increasing by 25.7 times.

A smaller administrative area, Al-Baha, had a smaller spread: 684 cases in Q2 2020 increased slowly to 11 143 by Q2 2023, marking an increase in Q3 2020. The three major towns/governorates having high spread included Al-Baha (244–3066; 12.6 times), Al-Mukhwah (118–1369; 11.6 times), and Biljurashi (103–3097; 30.1 times). Out of these, Biljurashi Town's spread could be considered wider than the other two, whereas the headquarters had a smaller spread. In addition, there were no periodic (seasonal) increases noted in Al-Baha and Al-Mukhwah, but there were seasonal increases noted in Biljurashi (Q3 2020, Q2 2021 and Q3 2021, and Q1 2022). The remaining Al-Baha recorded a rapid increase from 219 to 3611 cases, indicating an increase of 16.5 times.

Another smaller administrative area was Al-Jouf, which had a comparatively smaller spread: 248 cases in Q2 2020, which increased to 35 318 by Q2 2023, marking an increase in Q3 2020 (to 1350; 4.4 times) and Q1 2022 (11 935–15 738; 4.4 times). The only major town with a high spread was Sakaka, the head-

quarter (117–1952; 16.7 times) with the same seasonal hikes of Q3 2020 (to 656; 5.6 times) and Q1 2022 (1300–1819; 3.4 times). The rest of Al-Jouf recorded an almost equal spread, from a mere 131 to 2022 cases, increasing by 15.4 time.

Infections per population (1000 persons)

Absolute numbers, percentages, and proportions explain the spread of COVID-19 in a population, especially in Saudi Arabia, which has an unevenly distributed population. More than half of the population is concentrated in Riyadh, Makkah, and the Eastern Region administrative areas, where major administrative, educational, health, and developmental infrastructure are concentrated; 71 percent of COVID-19 infections occurred in areas that comprised 67.6% of the total population.

As the total infection rate in the country was 26.3 per 1000 persons, as per Q2 2023, administrative areas could be divided into three categories: more or less than the national average (25–30), lower than the national average (less than 25), and higher than the national average (more than 30), as shown in Table 2. The first group comprised Riyadh (27), Makkah (26), Al-Madina (27), Aseer (27), Jazan (24), and Najran (24). There were many seriously affected locations in the Riyadh Administrative area, including Wadi Ad Dawasir (11–65), followed by Hawtat Bani Tamim (9–61), Ad Dilam (2–47), and Afif (2–36). While Al-Kharj (3–14), the rest of Riyadh (3–16), and Ad Duwadimi (1–24) had low levels of spread, Riyadh City had a spread close to the total (7–28). In the Makkah administrative area, infection was widespread in Al-Lith (5–186), Khulays (18–154), and Al-Kamil (1–77). Makkah and Jeddah cities/governorates were less infected (10–26 and 7–26, respectively) than Al-Qunfudhah (5–51), Rabigh (2–36), and Taif (10–41). The remaining area was infected at a slower rate. The Al-Madina administrative area experienced a slow spread with an infection rate of seven in the beginning, which increased to 27 towards the end, with some towns/governorates having higher infections per 1000 persons, such as Khaybar (2–87), Yanbu (4–44), and Al-Ula (1–42). Al-Mahd (2–23) and Al-Madina City (10–26) showed a low spread. The Aseer administrative area had many locations affected by the widest spread, including Ballasmar (8–278), Sarat Abidah (5–97), and Zahran Al-Janub (4–72). Other localities/towns were less affected but had varying intensities, including Bishah (5–24) and Khamis Mushayt (5–24), followed by the rest of Aseer (2–16). Other locations, such as Abha, Ahad Rufaydah, Muhayil, and Rijal Al-Ma, were moderately affected. In the case of the Jazan administrative area, Baysh was the worst-affected town/governorate (32–134) from the beginning, followed by Abu Arish (2–67), Jazan City (3–60), Samtah (4–54), and Sabya (3–45). The other localities in the rest of the Jazan administrative area

were generally less affected. The last one in the group was the Najran administrative area, with two major affected locations: Najran City (3–23) and Sharorah Town (4–25). While this area was less widely affected (3–24), Sharorah was more affected than Najran City, the headquarters.

The second category comprises Al-Jouf, Hail, Tabouk, the Northern Borders, and Al-Qasim administrative areas, with less serious threats that were less widespread. Among these, the first three indicated a smaller spread, whereas the fourth indicated a major spread. As expected, the rural Al-Jouf was not seriously affected except for the headquarters of Sakaka, where the spread was slightly slower and less threatening. However, in the Hail administrative area, there was a reasonably serious threat to the headquarters, Hail City, with 3–25 infections per 1000 persons; other parts had a smaller spread (0–12). In contrast, the Tabouk administrative area was less widely affected (2–14), with Tabouk City (2–14) and the rest (1–14) showing mild attacks. In the Northern Borders administrative area, this epidemic spread very sparsely; the two affected locations were Arar (1–22) and Rafha (1–19), which showed lesser spread than that in other cities and towns. Other localities also had a similar pattern of spread, albeit less than what was previously mentioned, with Al-Qasim being a major administrative area that managed to largely contain the epidemic. Its spread was contained within 3–22 per 1000 individuals but with less geographical spread. Riyadh Al-Khabra was the most widely affected location (3–58), followed by Al-Midhnab (5–54), Al-Badai (2–31), and Unayzah (3–30), whereas the least affected locations were Buraydah and the rest of Al-Qasim.

The administrative areas, namely Al-Baha, the Northern Borders, and the Eastern Region, were negatively affected considering the share of the population. Although small, the Al-Baha administrative area had a large infection attack rate, not in its headquarters (3–34), Al-Baha City, but in Biljurashi (3–86) and Al-Mukhwah (4–52), whereas other locations had a smaller spread (1–19). The Eastern Region has received wide attention in the context of COVID-19, where the spread began, creating huge emergencies. Several cities, towns, and governorates were widely infected, giving rise to higher-than-national average scenarios of emergencies. Out of all the locations, the worst affected were Safwa (25–173) and Al-Qatif (61–143), followed by Al-Nuayriyah (6–77), Adh Dhahran (16–71), Buqayq (11–70), and Al-Jubayl (23–60). The least affected locations in this administrative area were Ad Dammam (9–30), Ras Tannurah (10–33), and Al Khubar (13–34).

In addition to the pattern of spread based on population size, per 1000 individuals, there were seasonal patterns as well, which might be similar to those mentioned in the previous section regarding the increase in COVID-19 spread.

Table 2. Patterns of COVID-19 spread per 1000 persons for various locations in each administrative area by quarters of 2020, 2021, 2022, and 2023

Administrative area/ Location	2020			2021				2022				2023	
	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2
Riyadh													
Ad Diriyah	22	24	25	26	27	28	28	31	31	31	32	32	32
Afif	2	10	12	14	21	26	26	32	34	35	35	35	36
Ad Duwadimi	1	5	6	7	11	13	13	20	21	22	23	23	24
Ad Dilam	2	8	12	23	34	37	37	45	47	47	47	47	47
Al-Kharj	3	5	5	7	8	9	9	12	14	14	14	14	14
Al-Majmaah	4	10	15	18	22	25	25	30	31	32	32	32	32
Hawtat Bani Tamim	9	21	24	31	43	47	47	57	60	60	61	61	61
Riyadh	7	8	9	10	14	15	16	24	26	27	28	28	28
Wadi Ad Dawasir	11	26	32	36	48	54	55	60	62	63	64	65	65
Rest of Riyadh	3	6	6	8	10	11	11	15	15	15	16	16	16
Total	6	8	9	11	14	16	16	23	25	26	26	27	27
Makkah													
Al-Kamil	1	11	14	16	37	51	51	76	77	77	77	77	77
Al-Lith	5	30	33	43	102	112	113	184	186	186	186	186	186
Jeddah	7	9	9	10	13	14	15	21	24	25	25	26	26
Khulays	18	46	52	53	62	65	66	152	154	154	154	154	154
Makkah	10	14	15	15	18	19	20	24	26	26	26	26	26
Al-Qunfudhah	5	23	24	26	37	43	43	50	51	51	51	51	51
Rabigh	2	4	4	4	6	7	8	34	35	36	36	36	36
Taif	10	19	20	21	26	30	30	36	38	39	40	40	41
Rest of Makkah	0	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	3
Total	7	10	11	12	15	17	17	23	24	25	25	26	26
Al-Madina													
Al-Ula	1	6	7	8	11	19	19	39	40	41	41	42	42
Khaybar	2	17	25	27	40	53	54	84	86	87	87	87	87
Al-Mahd	2	8	10	12	13	14	14	23	23	23	23	23	23
Yanbu	4	13	20	21	31	34	35	42	43	43	43	44	44
Al-Madina	10	14	16	16	18	18	18	23	25	26	26	26	26
Rest of Al-Madina	0	2	3	3	5	7	7	11	11	11	11	11	11
Total	7	12	14	15	18	19	20	24	26	26	26	26	27
Al-Qasim													
Al-Qasim	2	10	12	13	17	22	23	30	31	31	31	31	31
Al-Badai	5	24	29	30	36	45	45	53	54	54	54	54	54
Al-Midhnab	3	10	10	11	11	12	12	22	24	25	25	26	26
Ar Rass	4	9	10	10	12	13	14	17	18	18	19	19	19
Buraydah	3	19	26	27	37	47	47	58	58	58	58	58	58
Riyadh Al-Khabra Unayzah	3	11	13	14	17	21	21	27	28	29	30	30	30
Rest of Al-Qasim	1	6	7	8	10	13	13	16	16	16	16	16	16
Total	3	9	11	11	14	17	17	21	21	21	22	22	22
Eastern Region													
Al-Jubayl	23	31	33	35	40	46	47	56	57	58	59	59	60
Al-Khafji	3	9	11	14	24	32	32	41	42	43	43	43	44
Al-Mubarraz	9	26	28	29	35	37	38	43	43	43	43	44	44
Al-Nuayriyah	6	26	30	33	57	66	66	76	77	77	77	77	77
Buqayq	11	31	34	40	53	59	60	69	69	70	70	70	70
Ad Dammam	9	14	14	15	17	18	18	25	28	29	29	29	30
Adh Dhahran	16	29	31	35	43	48	49	60	65	67	68	70	71
Hafar Al-Batin	3	11	11	11	12	14	14	17	18	18	18	18	18
Al-Hufuf	26	45	47	49	54	56	57	73	76	77	78	78	79
Al-Khubar	13	18	18	19	21	24	24	31	32	33	33	33	34
Al-Qatif	61	93	96	101	106	112	113	138	140	141	142	143	143

Administrative area/ Location	2020			2021				2022				2023	
	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2
Eastern Region													
Ras Tannurah	10	19	20	21	22	24	24	33	33	33	33	33	33
Safwa	25	65	73	82	113	131	131	167	170	172	172	172	173
Rest of the Eastern Region	1	2	2	2	3	4	4	5	5	5	5	5	5
Total	10	17	18	19	22	24	24	29	31	31	32	32	32
Aseer													
Abha	6	15	16	16	21	25	26	36	39	41	41	41	42
Ahad Rufaydah	5	16	17	17	19	21	21	28	28	29	29	29	29
Ballasmar	8	84	106	112	173	249	249	267	272	277	277	277	278
Bishah	5	13	14	14	17	19	19	22	23	23	23	24	24
Zahrn Al-Janub	4	23	28	30	49	59	59	70	71	71	71	72	72
Khamis Mushayt	5	14	15	15	18	20	20	23	23	24	24	24	24
Muhayil	6	16	17	17	20	22	22	32	32	33	33	34	34
Rijal Al-Ma	2	15	18	18	23	28	28	34	34	34	34	34	34
Sarat Abidah	5	32	36	36	38	39	39	78	84	87	90	93	97
Rest of Aseer	2	9	9	9	11	13	13	15	15	16	16	16	16
Total	4	13	14	15	18	21	21	25	26	27	27	27	27
Tabouk													
Tabouk	2	6	7	7	9	10	10	13	13	14	14	14	14
Rest of Tabouk	1	3	3	4	6	8	8	14	14	14	14	14	14
Total	2	5	6	6	8	10	10	13	13	14	14	14	14
Hail													
Hail	3	12	14	15	17	20	20	24	24	25	25	25	25
Rest of Hail	0	3	4	4	7	9	9	12	12	12	12	12	12
Total	2	9	10	11	14	16	16	19	19	20	20	20	21
Northern Borders													
Arar	1	6	7	10	13	16	17	21	21	22	22	22	22
Rafha	1	6	7	8	9	15	15	19	19	19	19	19	19
Rest of Northern Borders	2	4	5	7	8	9	10	13	13	13	13	13	13
Total	1	6	7	9	12	15	15	18	18	19	19	19	19
Jazan													
Abu Arish	2	21	21	22	34	45	46	62	64	65	65	66	67
Baysh	32	70	70	71	81	88	89	126	129	130	132	132	134
Jazan	3	19	21	21	26	32	33	51	54	56	58	59	60
Sabya	3	17	17	18	23	27	27	42	44	45	45	45	45
Samtah	4	23	24	24	30	35	35	49	50	51	52	53	54
Rest of Jazan	0	2	2	3	4	6	6	8	8	8	8	8	8
Total	2	9	9	9	13	16	16	22	22	23	23	23	24
Najran													
Najran	3	11	12	12	15	18	18	21	22	22	23	23	23
Sharorah	4	14	14	15	17	19	19	24	25	25	25	25	25
Rest of Najran	1	5	6	7	11	18	18	24	24	24	24	24	24
Total	3	10	11	12	15	19	19	22	23	23	23	23	24
Al-Baha													
Al-Baha	3	6	6	7	9	13	13	22	26	31	32	33	34
Al-Mukhwah	4	20	28	29	34	37	38	49	51	52	52	52	52
Biljurashi	3	27	33	37	56	67	68	77	81	84	84	85	86
Rest of Al-Baha	1	9	11	12	12	14	14	18	19	19	19	19	19
Total	2	11	14	15	19	22	22	28	30	32	32	32	33
Al-Jouf													
Sakaka	1	3	3	4	5	6	6	9	9	9	9	9	10
Rest of Al-Jouf	0	1	1	2	3	4	4	5	5	5	5	5	5
Total	0	2	2	3	4	5	5	6	6	7	7	7	7
Country Total	6.1	10.6	11.5	12.7	15.9	17.8	18.1	23.3	24.7	25.4	25.7	25.9	26.3

Discussion

Saudi Arabia witnessed the COVID-19 pandemic across the country in administrative areas and almost all governorates with varying numbers of cases, speed, intensity, and share of the population. From the beginning of the infection, Saudi Arabia experienced highs and lows based on population size, urban growth, infrastructure, and economic sectors. For example, a high spread of the disease was reported in Riyadh, Makkah, and administrative areas of the Eastern Region. The second set of regions included Al-Madina, Aseer, Al-Qasim, and Jazan. Other regions had fewer infections. These could directly relate to urbanization, social and religious gatherings, commercial activities, and workplaces, despite the effective implementation of various containment measures all over the country, with seasonal variations [5, 6, 18, 21, 22, 23].

Almost all administrative areas passed the peak stage of infection, and thereby marked declines with substantial public health measures in place to confront political, monetary, and social difficulties [2, 15, 20]. Moreover, most of the cases constituted of travelers from other countries in the Eastern Region and contacts in the Riyadh, Makkah, and Al-Madina administrative areas, apart from medical professionals [17]. In addition, metropolitan cities, such as Makkah, Riyadh, Jeddah, and Al-Madina, had been seriously affected by overcrowding in residences, workplaces, religious places, commercial outlets, and social entertainment sites [17]. This regional disparity may be attributed to population size, population density, and professions that require travel. While the former administrative areas were urban centers, the others were hill stations with agricultural professions. It could be presumed that regions with more interpersonal contacts and dealings had more infections than other regions. This relates to the epidemic etiology and seasonal variations explained by scientists and medical professionals.

Apart from major metropolitan cities, administrative headquarters and smaller cities were infected in large numbers. In urban areas, owing to frequent movements and interpersonal contacts characterized by tertiary-level professions, there was a risk of asymptomatic transmission between travelers and their immediate contacts, which drove the growth of the pandemic, where frequent testing and social distancing, as countermeasures, were impractical, especially during peak seasons [1, 10]. Such frequent incidences occurred in urban centers in Riyadh (Ad Diriyah, Al-Kharj, and Wadi Ad Dawasir), Makkah (Taif), Al-Madina (Yanbu), Al-Qasim (Al-Badai, Ar Rass, and Buraydah), the Eastern Region (Al-Jubayl, Al-Mubarraz, Al-Nuayriyah, etc.), Aseer (Abha, etc.), Tabouk (Tabouk), Hail (Hail), the Northern Borders (Arar), Jazan (Abu

Arish etc.), Najran (Najran, Sharorah), Al-Baha (Biljurashi), and Al-Jouf (Sakaka). These were either administrative headquarters or major cities and townships with augmented population growth and economic infrastructure. The first case was detected in Al-Qatif, a medium-sized city (Khoshaim et al., 2020). Cities differ in demographic attributes, such as sex ratio, child population, geographical conditions, environmental situation, and availability of resources, such as hospitals and medical facilities [14].

This causes differences in monthly infected cases, increase in infection, and share of individuals infected, with differences across administrative areas and locations. In addition, there were differences in the spread across administrative areas and governorates depending on population, infrastructure, and professions. Fewer prospective administrative areas had lesser spread, confirming the effects of crowding, interpersonal contact, commercial establishments, and professions. This highlights the importance of emergency preparedness during epidemics. However, infections in such prominent administrative areas cannot be higher in terms of ratios and proportions based on population size, and are often higher in major urban pockets, locations, and townships. That is, the second-order administrative areas, cities, and neighborhoods were found to be at risk in terms of rapid growth and wider infections, such as Ballasmar, Safwa, Adh Dhahran, Wadi Ad Dawasir, Baysh, and Jazan.

Conclusion

Despite strenuous efforts by the Saudi Arabian Ministry of Health in coordination with other governmental and non-governmental agencies, COVID-19 spread rapidly in the country, with spatial and seasonal differences across administrative areas, major cities, and major residential and commercial locations. Out of the 13 administrative areas, Riyadh, Makkah, and the Eastern Region reported disease widespread; Al-Madina, Al-Qasim, Aseer, and Jazan had a medium level of spread; and Tabouk, Hail, the Northern Borders, Najran, Al-Baha, and Al-Jouf had a low level of spread. This classification could be related to the distribution of population and infrastructure in the country. Major cities, such as Riyadh, Jeddah, Makkah, Al-Madina, Buraydah, and Ad Dammam, faced a high level of spread, both in terms of the number of infected individuals and its increase, as there were certain locations, such as headquarters of governorates (Taif, Khamis Mushayt, Samtah, Biljurashi, Wadi Ad Dawasir, Yanbu, Ar Rass, etc.) and other major residential and commercial locations (Al-Mubarraz, Al-Hufuf, Safwa, Ballasmar, etc.), that were reported to have a high rate of COVID-19 infection.

The increase in COVID-19 infection in the country during the peak seasons of Q3 2020, Q2 2021, and Q1 2022 threatened human lives, causing anxiety and apprehension. A significant increase was reported in the major administrative areas of Riyadh, Makkah, Al-Madina, Al-Qasim, and the Eastern Region. In addition, the increases in Wadi Ad Dawasir, Taif, Ar Rass, Al-Jubayl, Al-Hufuf, Safwa, Khamis Mushayt, Samtah, and Biljurashi were faster. In other words, the number of upcoming townships and promising future cities were impacted by the rapid increase. In these specified locations, the infection spread to a major share of the population.

Based on the statistics of the spread of COVID-19, administrative areas were divided into three categories: major spread (Al-Baha, the Northern Borders, and the Eastern Region), medium spread (Riyadh, Makkah, Al-Madina, Aseer, Najran, and Jazan), and low spread (Al-Qasim, Al-Jouf, Hail, and Tabouk). This classification provides insights into emergency preparedness, strategies for controlling and combating infectious diseases, and future considerations. It also highlights the need to concentrate on medium-sized and upcoming neighborhoods that are fast-growing in terms of population and infrastructure.

References

1. Abohamr S.I., Abazid R.M., Aldossari M.A., Amer H.A., Badhawi O.S., Aljunaidi O.M., Alzarzour S.H., Saadeddin H.M., Bhat F.A., Elsheikh E. Clinical characteristics and in-hospital mortality of COVID-19 adult patients in Saudi Arabia. *Saudi Med. J.*, 2020, vol. 41, no. 11, pp. 1217–1226. doi: 10.15537/smj.2020.11.25495
2. Ahmad N. COVID-19 modeling in Saudi Arabia using the modified susceptible-exposed-infectious-recovered (SEIR) model. *Cureus*, 2020, vol. 12, no. 9: e10452. doi: 10.7759/cureus.10452
3. Al-Otaibi S.T. The battle against Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the Kingdom of Saudi Arabia. Public health perspective. *Saudi Med. J.*, 2020, vol. 41, no. 12, pp. 1285–1291. doi: 10.15537/smj.2020.12.25459
4. Alabdulkarim N., Alsultan F., Bashir S. Gulf countries responding to COVID-19. *Dubai Med. J.*, 2020, vol. 3, no. 2, pp. 58–60. doi: 10.1159/000508662
5. Alanezi F., Aljahdali A., Alyousef S., Alrashed H., Alshaikh W., Mushcab H., Alanzi T. Implications of Public Understanding of COVID-19 in Saudi Arabia for fostering effective communication through awareness framework. *Front. Public Health*, 2020, vol. 8: 494. doi: 10.3389/fpubh.2020.00494
6. Aldossari H.M. Exploring interrelationships of COVID-19 dimensions in Saudi Arabia: a systematic review. *Bull. Natl Res. Cent.*, 2023, vol. 47, no. 1: 73 doi: 10.1186/s42269-023-01041-w
7. Almaghlouth I., Islam T., Alamro N., Alsultan A., Alfadda A., Al-Muhsen S., Almasry A., Almadi M.A., Hersi A., BaHamam A. Mapping COVID-19 related research from Saudi Arabia, a scoping review. Between reality and dreams. *Saudi Med. J.*, 2020, vol. 41, no. 8, pp. 791–801. doi: 10.15537/smj.2020.8.25163
8. Alqarni M.S., Alghamdi M., Muhammad T., Alshomrani A.S., Khan M.A. Mathematical modeling for novel coronavirus (COVID-19) and control. *Numer. Methods Partial Differ. Equ.*, 2022, vol. 38, no. 4, pp. 760–776. doi: 10.1002/num.22695
9. Alrasheed H., Althnian A., Kurdi H., Al-Mgren H., Alharbi S. COVID-19 Spread in Saudi Arabia: modeling, simulation and analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020, vol. 7, no. 21: 7744. doi: 10.3390/ijerph17217744
10. Alshammari F.S. A mathematical model to investigate the transmission of COVID-19 in the Kingdom of Saudi Arabia. *Comput. Math. Methods Med.*, 2020, vol. 2020: 9136157. doi: 10.1155/2020/9136157
11. Alyami M.H., Naser A.Y., Orabi M.A.A., Alwafi H., Alyami H.S. Epidemiology of COVID-19 in the Kingdom of Saudi Arabia: an ecological study. *Front. Public Health*, 2020, vol. 8: 506. doi: 10.3389/fpubh.2020.00506
12. Barry M., Al Amri M., Memish Z.A. COVID-19 in the Shadows of MERS-CoV in the Kingdom of Saudi Arabia. *J. Epidemiol. Glob. Health*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 1–3. doi: 10.2991/jegh.k.200218.003
13. Barry M., Ghonem L., Alsharidi A., Alanazi A., Alotaibi N.H., Al-Shahrani F.S., Al Majid F., Bahammam A.S. Coronavirus disease-2019 pandemic in the Kingdom of Saudi Arabia: mitigation measures and hospital preparedness. *J. Nat. Sci. Med.*, 2020, vol. 3, no. 3, pp. 155–158. doi: 10.4103/JNSM.JNSM_29_20
14. Baz A., Alhakami H. Fuzzy based decision making approach for evaluating the severity of COVID-19 pandemic in cities of Kingdom of Saudi Arabia. *Comput. Mater. Contin.*, 2021, vol. 66, no. 2, pp. 1155–1147. doi: 10.32604/cmc.2020.013215
15. Esmat M.A.E. How AI, data science and technology is used to fight the pandemic COVID-19: case study in Saudi Arabia environment. *Research in World Economy*, 2020, vol. 11, no. 5, pp. 409–419. doi: 10.5430/rwe.v11n5p409

Additional information

Ethics approval and consent to participate. As this manuscript is based upon published data, ethics approval and consent to participate are not applicable

Consent for publication. As this manuscript is based upon published data, consent for publication is not applicable. However, the authors express their consent to publish this manuscript in your esteemed journal.

Availability of data and materials. This research used a compilation of daily status reports published by Ministry of Health, Saudi Arabia (<https://sehhty.com>). The compiled data, in Excel worksheet, may be made available on request. Detailed analysis, month-wise, are presented as a supplementary file.

Competing interests. There are no competing interests or conflict of interests.

Acknowledgements. The authors would like to extend their sincere appreciation to the Deanship of Scientific Research at Imam Mohammed Ibn Saud Islamic University, Riyadh, for its funding of this research through the Research Group Number IMSIU-RG23162. Also, the authors would like to thank Muna Hammad Aldossari for her collaborative effort for data collection and formatting.

16. Ismail A., Alagha O. The impact of COVID-19 lockdown on the air quality of Eastern Province, Saudi Arabia. *Air Qual. Atmos. Health*, 2021, vol. 14, no. 1, pp. 117–128. doi: 10.1007/s11869-020-00918-3
17. Jdaitawi M., Jdaitawi L., Alkurdi R. Analyzing the spread of COVID-19 in Saudi Arabia and controlling disease strategies. *Int. J. Intern. Emerg. Med.*, 2020, vol. 3, no. 1: 1028.
18. Jokhdar H., Khan A., Asiri S., Motair W., Assiri A., Alabdulaali M. COVID-19 mitigation plans during Hajj 2020: a success story of zero cases. *Health Secur.*, 2021, vol. 19, no. 2, pp. 133–139. doi: 10.1089/hs.2020.0144
19. Khoshaim H.B., Al-Sukayt A., Chinna K., Nurunnabi M., Sundarasesen S., Kamaludin K., Baloch G.M., Hossain S.F.A. Anxiety level of university students during COVID-19 in Saudi Arabia. *Front. Psychiatry*, 2020, vol. 11: 579750. doi: 10.3389/fpsy.2020.579750
20. Obied D.A., Alhamlan F.S., Al-Qahtani A.A., Al-Ahdal M.N. Containment of COVID-19: the unprecedented response of Saudi Arabia. *J. Infect. Dev. Ctries*, 2020, vol. 14, no. 7, pp. 699–706. doi: 10.3855/jidc.13203
21. Salam A.A., Al-Khraif R.M., Dilip T.R., Elsegaey I. Coronavirus disease 2019 in proportion to population: a historical analysis of Saudi Arabia. *Bull. Natl. Res. Cent.*, 2022, vol. 46, no. 1: 198. doi: 10.1186/s42269-022-00876-z
22. Salam A.A., Al-Khraif R.M., Elsegaey I. COVID-19 in Saudi Arabia: an overview. *Front. Public Health*, 2022, vol. 9: 736942. doi: 10.3389/fpubh.2021.736942
23. Yezli S., Khan A. COVID-19 social distancing in the Kingdom of Saudi Arabia: bold measures in the face of political, economic, social and religious challenges. *Travel Med. Infect. Dis.*, 2020, vol. 37: 101692. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101692

Авторы:

Альдоссари Х.М., доктор философии, кафедра географии и географических информационных систем, Исламский университет имама Мухаммеда ибн Сауда, Эр-Рияд, Саудовская Аравия;

Абдул Салам А., доктор философии, Институт демографических исследований, Университет короля Сауда, Эр-Рияд, Саудовская Аравия.

Authors:

Aldossari H.M., DSc (Philosophy), Department of Geography and Geographical information systems, Imam Mohammed Ibn Saud Islamic University, Riyadh, Saudi Arabia;

Abdul Salam A., DSc (Philosophy), Institute of Demographical Studies, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia.

Поступила в редакцию 14.11.2023
Принята к печати 21.12.2023

Received 14.11.2023
Accepted 21.12.2023

ANALYSIS OF TEMPERATURE, HUMIDITY, RAINFALL, AND WIND VELOCITY ON DENGUE HEMORRHAGIC FEVER IN BANDUNG MUNICIPALITY

A. Sutriyawan^a, N. Kurniati^b, Novianti^b, U. Farida^c, L. Yusanti^b, S.N. Destriani^b, M.K.F. Saputra^d

^a Bhakti Kencana University, Bandung, Indonesia

^b University of Bengkulu, Bengkulu, Indonesia

^c Bhakti Wiyata Institute of Health Sciences, Kediri, Indonesia

^d Baitul Hikmah Nursing Academy, Bandar Lampung, Indonesia

Abstract. The trend of dengue hemorrhagic fever prevalence every year continues to show an increase and number of deaths. This is due to an increase in the population of aedes aegypti mosquitoes. Climate change has the potential to affect mosquito-borne diseases, including dengue fever, which is a vulnerability for residents in Bandung Municipality. This research aims to analyse the relationship between temperature, humidity, rainfall, and wind velocity with dengue hemorrhagic fever in Bandung Municipality. The methodology research used in this study is descriptive analysis with a cross-sectional approach. This research was conducted in Bandung Municipality. The study samples were taken from data on dengue hemorrhagic fever sufferers, as well as data on temperature, humidity, rainfall, and wind speed. This study used secondary data. The data collected is in the form of data on temperature, humidity, rainfall, and wind speed, and the number of cases. To assess the correlation between variables using the person correlation test. To test the effect of all four variables simultaneously on the incidence of dengue hemorrhagic fever using a linear regression test. Average value of air temperature is 25.8°C, air humidity is 69.9%, rainfall is 201.5 mm, and the wind velocity is 1.8 knots. The prevalence of dengue hemorrhagic fever is 232.5 cases. There is a significant relationship between humidity with dengue hemorrhagic fever prevalence ($p = 0.018$, $r = 0.873$). Wind velocity with dengue hemorrhagic fever prevalence ($p = 0.018$, $r = 0.629$). The result of the coefficient of determination test on temperature, humidity, rainfall, and wind velocity with DHF cases is $R^2 = 0.745$. The increase in dengue prevalence in Bandung City occurred from January to June, the decrease in prevalence occurred from July to December. Variations in temperature, humidity, rainfall and wind speed can simultaneously affect the incidence of dengue fever in Bandung. Therefore, in the future it is necessary to increase mosquito nest eradication activities to prevent dengue transmission considering that this disease has the potential to spread at any time.

Key words: prevalence of dengue fever, climate, temperature, humidity, rainfall, wind velocity.

Адрес для переписки:

Агунг Сутрияван
40614, Индонезия, Бандунг, ул. Сукарно Хатта, 754,
Университет Бхакти Кенчана.
Тел.: +6282377700705.
E-mail: agung.epid@gmail.com

Contacts:

Agung Sutriyawan
40614, Indonesia, Bandung, Soekarno Hatta str., 754,
Department of Public Health, Bhakti Kencana University.
Tel.: +6282377700705.
E-mail: agung.epid@gmail.com

Для цитирования:

Сутрияван А., Курниати Н., Новианти, Фариди У., Юсанти Л., Дестриани Ш.Н., Сапутра М.Х.Ф. Анализ взаимосвязи между температурой, влажностью, количеством осадков и скоростью ветра и распространенностью геморрагической лихорадки денге в муниципалитете Бандунга // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 155–162. doi: 10.15789/2220-7619-AOT-2110

Citation:

Sutriyawan A., Kurniati N., Novianti, Farida U., Yusanti L., Destriani S.N., Saputra M.K.F. Analysis of temperature, humidity, rainfall, and wind velocity on dengue hemorrhagic fever in Bandung municipality // Russian Journal of Infection and Immunity = Infeksiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 155–162. doi: 10.15789/2220-7619-AOT-2110

© Sutriyawan A. et al., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AOT-2110>

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ТЕМПЕРАТУРОЙ, ВЛАЖНОСТЬЮ, КОЛИЧЕСТВОМ ОСАДКОВ И СКОРОСТЬЮ ВЕТРА И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬЮ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ В МУНИЦИПАЛИТЕТЕ БАНДУНГА

А. Сутрияван¹, Н. Курниати², Новианти², У. Фариди³, Л. Юсанти², Ш.Н. Дестриани², М.Х.Ф. Сапутра⁴

¹ Университет Бхакти Кенчана, Бандунг, Индонезия

² Университет Бенгкулу, Бенгкулу, Индонезия

³ Институт наук о здоровье Бхакти Вията, Кедири, Индонезия

⁴ Академия медсестер Байтул Хикмах, Бандар Лампунг, Индонезия

Резюме. Распространенность геморрагической лихорадки денге и смертность от нее с каждым годом продолжают демонстрировать тенденцию к росту, что обусловлено увеличением численности популяции комаров *Aedes aegypti*. Изменение климата может опосредованно влиять на распространенность заболеваний, переносимых комарами, включая лихорадку денге, которая представляет опасность для жителей муниципалитета Бандунг. Настоящее исследование было направлено на изучение взаимосвязи между температурой, влажностью, количеством осадков и скоростью ветра и распространенностью геморрагической лихорадки денге в муниципалитете Бандунг, для чего был использован метод поперечного описательного анализа. Собранные данные представляли собой информацию о температуре, влажности, количестве осадков и скорости ветра, а также о количестве случаев заболеваний геморрагической лихорадкой денге. Корреляция между переменными оценивалась с помощью теста корреляции Пирсона. Одновременное влияние всех четырех переменных на заболеваемость геморрагической лихорадкой денге анализировалось с помощью линейного регрессионного теста. Среднее значение температуры воздуха составило 25,8°C, влажности воздуха — 69,9%, количества осадков — 201,5 мм, скорости ветра — 1,8 узла. Распространенность геморрагической лихорадки денге составила 232,5 случая. Описана достоверная взаимосвязь между влажностью и распространенностью геморрагической лихорадки денге ($p = 0,018$, $r = 0,873$), а также между скоростью ветра и распространенностью геморрагической лихорадки денге ($p = 0,018$, $r = 0,629$). Оценка коэффициента определения температуры, влажности, количества осадков и скорости ветра на заболеваемость геморрагической лихорадкой денге составляет $R^2 = 0,745$, то есть перечисленные метеорологические показатели одновременно способны определять распространенность геморрагической лихорадки денге на 74,5%. Повышенный риск заболеваемости геморрагической лихорадкой денге зависит от влажности и скорости ветра. Изменения климата, проявляющиеся колебаниями метеорологических показателей, могут одновременно влиять на увеличение числа случаев геморрагической лихорадки денге. В дальнейшем необходимо прилагать больше усилий по эрадикации комаров для предупреждения передачи геморрагической лихорадки денге, учитывая всевозрастающий потенциал ее распространения.

Ключевые слова: распространенность лихорадки денге, климат, температура, влажность, количество осадков, скорость ветра.

Introduction

Dengue hemorrhagic fever (DHF) is a disease with an excessive morbidity and mortality rate in international locations with tropical and subtropical DHF is transmitted from the bite of the aedes aegypti and aedes albopictus mosquito, defined as the dengue virus [7, 10]. Global warming and environmental change cause enormous dengue fever cases in every part of the world, where mosquito bites will increase and cause the rise of DHF cases [5]. There is one study that calculated 390 million DHF infections every year. Another study on the prevalence of DHF estimates that 3.9 billion people are at risk of infection. Although the risk of infection is in 129 countries, 70% come from Asia [19, 26]. From 2015 to 2019, DHF cases in Southeast Asia increased by 46%, whereas the death rate decreased by 2%. One of the main problems is the uprising of DHF cases in Southeast Asia [34].

Indonesia has the most prominent DHF burden cases in Southeast Asia. Indonesia had 248 127 cases in 2019. A significant increase emerged from the pre-

vious year, 65 602 cases. Other than that, there was also an increase in fatality cases from 0.65 to 0.94 [20, 21]. Indonesia still has many DHF-endemic cities. As per the previous study in Yogyakarta, the peak of DHF prevalence happened seasonally between November and May. This incident in Yogyakarta was proven by the high cases of DHF that being hospitalised and high seroprevalence from dengue fever disease, dengue virus neutralising antibody (68%) for children from 1–10 years old [13].

Specific antiviral treatments or vaccines to prevent dengue hemorrhagic fever are not yet available, so the only way to control the incidence of dengue fever is through vector control [31]. Many control efforts have been carried out by programs at the central and regional levels, including mosquito nest eradication activities by draining, closing, burying water reservoirs and affixing larvicides, maintaining larva-eating fish and using mosquito nets, periodic inspection and eradication of larvae no later than once every 3 months, and fumigation [1]. However, this action has not been able to reduce the number of dengue sufferers nationally, and this shows that anticipatory

steps have not worked well because countermeasures are still reactive.

Fluctuations in DHF incidence and distribution of DHF cases like other vector-borne diseases are influenced by climate, but how and how much influence from climatic factors on the intensity of transmission of vector-borne pathogens is still not known with certainty [17]. Several studies have stated the influence of variations in climate factors on the distribution of DHF cases [8, 12, 21]. Impact on life cycle, biting behavior, infectivity and resistance of vectors and incubation period of dengue virus [9, 38]. Although the effect of climate change on vector-borne diseases is an indirect influence, it needs to be a concern because it can affect the ability of vectors to transmit diseases.

Based on previous findings, the spread dynamic of dengue fever is a little indirect, and the effect of temperature and humidity is also significant and complex. The higher rainfall anomaly, like +69,74 (240 mm rainfall), the DHF case tends to be lower than the amount of DHF cases in average rainfall. With the increase in rainfall intensity (200 mm above average annually), dengue fever cases tend to decrease [15]. The study on air humidity in Singapore stated that the weather factor is the best predictor among other weather factors being analysed. High humidity is associated or linked with the rise of dengue fever occurrences. Thus, humidity has the potential to be a weather element to predict scarlatina or scarlet fever and help to push the prevention attempt of dengue fever in the future [36]. Humidity also affects the mosquito's life because low humidity will shorten the mosquito's lifetime. 60% of humidity rate is the lowest limit for aedes aegypti mosquitos to live [24].

Better understanding and prediction of DHF outbreaks and their transmission risks based on temporal data is needed so that vector control resources can be optimally allocated. This research tested the relationship between climate and DHF occurrences in Bandung Municipality using a cross-sectional survey design and correlation test. Epidemiology studies have often used the correlation test to explore the relationship between climate and various infectious diseases (for instance, a disease infected through a vector) [11, 22]. This study is suitable to use as the basis for the periodic prevention of DHF. Furthermore, the researchers analysed how much the climate influenced the increase in DHF cases.

Materials and methods

Location and research design. The research was conducted in Bandung, West Java. The basis for viewing and sample selection as Bandung is an endemic region of DHF. The research methodology used in this study is a descriptive analysis with a cross-sectional survey design. This study has been approved by

the Ethical Committee of STIK Immanuel Bandung, decisions number 054/KEPK/STIKI/VI/2021.

Population and research sample. The sample of this research was gathered and measured from the combined DHF data throughout 2020, inscribed in the Bandung Health Office, along with the data of temperature, humidity, rainfall, and wind velocity from the Central Bureau of Statistics for the City of Bandung in 2021.

Data collection. This research used secondary data from the Bandung Health Office and the Central Bureau of Statistics for the City of Bandung. The data is like the temperature, humidity, rainfall, wind velocity, and total DHF cases.

Data analysis. The data process used a descriptive analysis test, and then the researchers analysed the correlation between temperature, humidity, rainfall, and wind velocity variables with DHF case occurrence. Those five variables were described in one year, January-December. The temperature was dispersed in °C, humidity in percentage, rainfall in millimetres (mm), wind velocity in knots, and the occurrence of DHF cases on the amount total of the event. To evaluate the correlation between the variables, the researchers used Pearson Correlation Test. The researchers used a linear regression test to test four variables' effect on DHF cases simultaneously.

Results

The highest air temperature in Bandung occurred in September, around 26.9°C, whereas the lowest was in February, around 25.2°C. The highest air temperature also occurred in February, around 76.4%, while the lowest occurred in September, around 59.7%. The highest rainfall occurred in February, around 337 mm, and the lowest occurred in August, around 42 mm. The highest rainfall occurred in December, around 2.7 knot, as the lowest was in May at 1.3 knot. The highest number of DHF cases in Bandung city occurred in May for around 479 cases, whereas the lowest was in October for around 60 cases (Table 1 and Figure).

Based on Table 2, the average value of air temperature is 25.8°C with SD in the amount of 0.44°C. The average air humidity value is 69.9%, with SD as big as 5.0%. The average rainfall value is 201.5 mm, with SD as big as 115.0 mm. The average weight of wind velocity is 1.8 knots with SD in the amount of 0.3 knots. The average DHF prevalence during the whole of 2022 in Bandung Municipality is 232.5 cases, with SD as big as 148.7.

Based on Table 3, the results of the Pearson Correlation Test on temperature with DHF events (p) is 0.324 (> 0.05). The correlation coefficient (r) is $-0,312$; hence, it has no significant relationship between temperature and DHF prevalence. Humidity with DHF prevalence (p) is 0.018 (< 0.05). The correlation coefficient (r) is 0.668, significantly affecting

Table 1. Frequency distribution of temperature, humidity, rainfall, and wind velocity and prevalence of DHF during 2020 in Bandung Municipality

Month	Temperature	Humidity	Rainfall	Wind Velocity	Prevalence
January	25.7	73.9	207.6	2.1	248
February	25.2	76.4	337.0	1.9	330
March	25.8	73.9	291.0	1.5	479
April	25.9	74.4	271.0	1.4	409
May	25.9	74.3	292.0	1.3	365
June	26.0	68.4	30.0	1.8	335
July	25.4	65.1	64.0	1.9	209
August	26.2	64.1	42.0	1.9	107
September	26.9	59.7	88.0	2.1	77
October	25.8	69.8	327.0	1.9	60
November	26.2	68.4	207.0	1.7	74
December	25.4	70.5	262.0	2.7	97

Source: Taken from Bandung Municipality Health Office and Bandung City Central Statistics Agency report in 2021.

humidity and DHF prevalence. Rainfall with DHF prevalence (p) is 0.383 (> 0.05). The correlation coefficient (r) is 0.277; hence it be concluded that it has no significant relationship between rainfall and DHF prevalence. Wind velocity with DHF prevalence (p) is 0.028 (< 0.05). The correlation coefficient (r) is -0.629 , which means it has a significant relationship between wind velocity and DHF prevalence.

This significant correlation between p and the correlation coefficient concluded that the closeness of the relationship between humidity and DHF prevalence has a tight positive correlation. It means the higher humidity is, the more prevalence of DHF cases increases. The closeness of the relationship between wind velocity and DHF prevalence has a tight negative correlation. It means the lower the wind velocity is, the higher prevalence of DHF cases.

Discussion

The highest prevalence of DHF in Bandung Municipality during 2020 was 479 cases in March with a temperature of 25.8°C , while the lowest prevalence of DHF was 60 cases in October with a temperature of 25.8°C .

This is because the temperature in Bandung City changes relatively every month. This same temperature is caused by the peak rainfall in the city of Bandung occurs in November to March while rainy days begin to increase since September. This means that in October the beginning of rainfall increases, so that people usually immediately anticipate dengue transmission, while in March, is the end of high rainfall, in this period people usually begin to neglect preventive measures. In line with

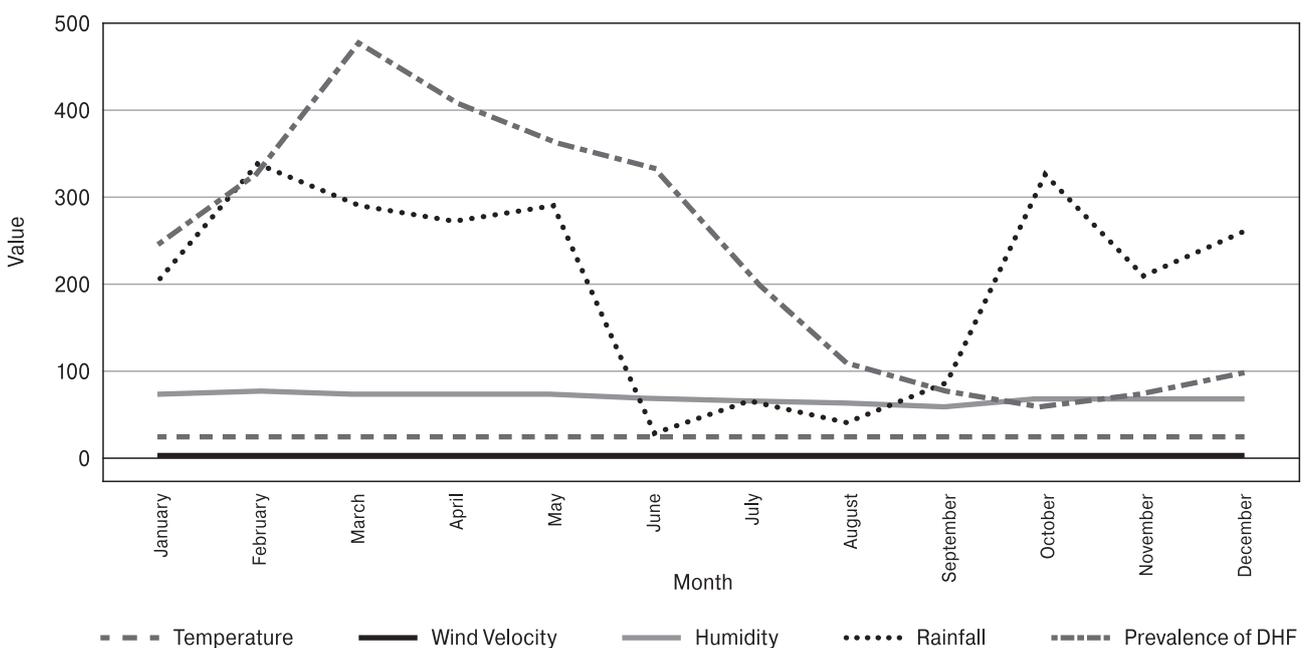


Figure. Month-wise dengue cases during 2020 in Bandung Municipality

Table 2. Mean, median, standard deviation, minimum maximum value of temperature, humidity, rainfall, wind velocity and prevalence of DHF in Bandung 2020

Variable	Mean	Median	SD	Min	Max
Temperature	25.867	25.850	0.4499	25.2	26.9
Humidity	69.908	70.150	5.0403	59.7	76.4
Rainfall	201.550	234.800	115.0138	30.0	337.0
Wind Velocity	1.850	1.900	0.3705	1.3	2.7
Prevalence	232.50	228.50	148.766	60	479

Table 3. Results of correlation analysis between temperature, humidity, rainfall, and wind velocity to prevalence of DHF during 2020 in Bandung

Variable	Incident of DHF		Signification
	p-value (p)	Correlation coefficient (r)	
Temperature	0.324	-0.312	The correlation is no significant
Humidity	0.018	0.668	The correlation is significant, the positive is strong
Rainfall	0.383	0.277	The correlation is no significant
Wind Velocity	0.028	-0.629	The correlation is significant, the negative is strong

this research, the problem of climate and weather variability in Indonesia is changing in several regions in Indonesia. Previous studies in Java and Bali using the Local Indicator of Spatial Association (LISA) portrayed DHF case distribution patterns. They resulted in information on the aggregation of dengue cases through observation every month in January, June, August, and November [25].

Dengue is an infectious disease transmitted by tropical mosquitoes and caused by an arbovirus [27]. In the city of Bandung, the types of mosquitoes that are often encountered are *aedes aegypti* and *aedes albopictus*. These mosquitoes can survive at low temperatures that is the range of 10°C. The metabolic will decrease and can even be triggered when the temperature drops below the critical temperature of 4.5°C. A temperature higher than 35°C also changes because physiological processes are slower. The optimum average temperature for mosquito growth is 25–30°C. Air temperature affects the development of the virus in the mosquito body, the speed of biting, the behaviour of rest and mating, and the spread and duration of the gonotrophic cycle [16, 28].

Previous studies have stated that changes in temperature and humidity are significantly associated with an increased incidence of dengue fever [4]. A study in Taiwan evaluating the impact of weather variability on dengue incidence using the Autoregressive Integrated Moving Average (ARIMA) model showed that weather variability is a significant indicator of an increase in dengue incidence in metropolitan cities. Assessing the adverse health impacts associated with climate change often requires analysis at different geographic scales and times. Large-scale prediction models are known to provide valuable information that projects global potential in dengue epidemics when there is an increase in temperature [35]. This research is in line with Wirayoga, which proves that changes in humidity provide a significant relationship with moderate

Table 4. Result of prediction of DHF prevalence and simultaneous test of temperature, humidity, rainfall, and wind velocity to prevalence of DHF during 2020 in Bandung

Dependent Variable: Prevalence	
R	0.863
R Square	0.745
F	5.102
Anova (Simultan)	0.030

levels. Positive relationships and relationships are increased humidity followed by an increase in the prevalence of DHF disease and vice versa. However, this is only partially the case in almost every occurrence because there are times when humidity increases and the incidence of DHF decreases [33].

Mosquitoes use the respiratory system of air pipes (trachea) with holes in the walls of the mosquito body (spiracles). The spiral is wide open without any regulatory mechanism. If low humidity can cause water to evaporate from the body, this causes fluids in the body to mongering. It is known that one of the enemies of mosquitoes is evaporation. Clamps can affect mosquito lifespan, rest, biting habits, flight distance, and breeding speed [32]. Optimum temperatures and low humidity can increase vector production, while low humidity can decrease mosquitoes' survival effectiveness. Diverse variations in humidity, temperature, and rainfall play an essential role and influence mosquito populations [37]. Previous studies have stated a tendency to increase the incidence of dengue in tropical regions in Indonesia, such as Sumatra and Sulawesi, that have the potential to be affected by climate warming. The occurrence of dengue cases is sporadic in Kalimantan due to the burning of forests and land, which results in an increase in temperature and humidity, which has an impact on the dynamics of large mosquito populations in the surrounding environment. In Java Island, the popula-

tion density continues to increase, resulting in ecological transformation so that humans and the people are deficient against dengue infection [2, 37].

Climatic variations can substantially modify vector-borne diseases. *Aedes aegypti* is the primary vector of several infectious diseases transmitted by vectors. Its ecology is currently an essential focus because, climatically, it is the primary determinant of mosquito habitat [6]. Different climatic factors affect the growth and survival of *aedes aegypti*; temperatures regulate reproduction rates, maturation and death, and precipitation results in breeding grounds for larvae and pupae. Unlike other species of mosquitoes, *aedes aegypti* eggs are laid above the water's surface and hatch only when the water level rises and wets them. The long survival time of its dried eggs gives *aedes aegypti* a competitive advantage over other mosquito species during long periods of drought. Still, winter rains can force the hatching and subsequent death of larvae. Determining how climate change affects these mosquitoes' geographical distribution cannot be underestimated [30]. Studies in Japan studied the continuity of hid larvae in Nagasaki. They argued that winter rainfall could cause mosquito eggs to hatch before spring so that larvae could die from low temperatures [29]. Similarly, field studies in Taiwan showed that larval mortality increases rapidly due to cold weather. Since rainfall can trigger the hatching process, winter rainfall can negatively impact *aedes aegypti* and can colonise new areas, especially in «cool margins» areas [3].

Wind velocity at sunrise and sunset at which mosquitoes fly in or out of the house determines human contact with mosquitoes. Wind velocity ranging from 11–14 m/s affects or impedes mosquito flight. Wind velocity will affect the flight distance of mosquitoes. A study in Banjarmasin City, Indonesia, states an average wind velocity of 4–6 knots. This speed cannot inhibit mosquitoes from flying and can be ideal for mosquito vectors [14]. Previous analysis also found that winds could affect spatial patterns of dengue transmission in Iquitos. It has been observed that

mosquitoes can seek shelter during solid winds; thus, there is a positive relationship between wind speed and *aedes aegypti*. Breezy conditions can increase the likelihood of mosquitoes hiding indoors [23]. The high spread of cases and the impact of endemic tropical diseases in Indonesia were also carried out in the research of Kusnoputra et al. in the Depok and Bogor regions, where the number of dengue cases increased due to the environment and climate change. Based on the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) prediction in 1996, it is also stated that the incidence of dengue fever in Indonesia will increase three times from 2070 if it occurs in the environment and society with unchanged conditions [18].

Conclusion

The increase in dengue prevalence in Bandung City occurred from January to June, the decrease in prevalence occurred from July to December. There is a significant relationship between humidity and wind speed and DHF prevalence. Variations in temperature, humidity, rainfall and wind speed can simultaneously affect the incidence of DHF in Bandung. It is necessary to increase mosquito nest eradication activities to prevent DHF transmission considering that this disease has the potential to spread at any time. Further studies need to be carried out to determine the relationship between climate factors and dengue incidence by adding other variables, such as the presence of vectors, free numbers of larvae, community participation in eradicating mosquito nests, population density, urbanization flows and program management.

Acknowledgments

The author's gratitude goes to the Center for Research and Community Service at Bhakti Kencana University (LPPM-UBK) for providing support so that this research can be carried out as expected.

References

1. Anwar A., Ariati J. Dengue hemorrhagic fever (DHF) prediction model based on climate factors in Bogor city, West Java. *Indonesian Bulletin of Health Research*, 2014, vol. 42, no. 4: 20092. doi: 10.22435/bpk.v42i4 Des.3663.249-256
2. Carrington L.B., Armijos M.V., Lambrechts L., Barker C.M., Scott T.W. Effects of fluctuating daily temperatures at critical thermal extremes on *Aedes aegypti* life-history traits. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 3: e58824. doi: 10.1371/journal.pone.0058824
3. Chang L.H., Hsu E.L., Teng H.J., Ho C.M. Differential survival of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) larvae exposed to low temperatures in Taiwan. *J. Med. Entomol.*, 2007, vol. 44, no. 2, pp. 205–210. doi: 10.1603/0022-2585(2007)44[205:ds oaaa]2.0.co;2
4. Chen Y., Yang Z., Jing Q., Huang J., Guo C., Yang K., Chen A., Lu J. Effects of natural and socioeconomic factors on dengue transmission in two cities of China from 2006 to 2017. *Sci. Total Environ.*, 2020, vol. 724: 138200. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138200
5. Cheng J., Bambrick H., Frentiu F.D., Devine G., Yakob L., Xu Z., Li Z., Yang W., Hu W. Extreme weather events and dengue outbreaks in Guangzhou, China: a time-series quasi-binomial distributed lag non-linear model. *Int. J. Biometeorol.*, 2021, vol. 65, no. 7, pp. 1033–1042. doi: 10.1007/s00484-021-02085-1
6. Dhimal M., Gautam I., Joshi H.D., O'Hara R.B., Ahrens B., Kuch U. Risk factors for the presence of chikungunya and dengue vectors (*Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*), their altitudinal distribution and climatic determinants of their abundance in central Nepal. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2015, vol. 9, no. 3: e0003545. doi: 10.1371/journal.pntd.0003545

7. Ferreira-de-Lima V.H., Lima-Camara T.N. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. *Parasit. Vectors*, 2018, vol. 11, no. 1: 77. doi: 10.1186/s13071-018-2643-9
8. Fuller D.O., Troyo A., Beier J.C. El Niño Southern Oscillation and vegetation dynamics as predictors of dengue fever cases in Costa Rica. *Environ. Res. Lett.*, 2009, vol. 4, pp. 140111–140118. doi: 10.1088/1748-9326/4/1/014011
9. Fouque F., Carinci R., Gaborit P., Issaly J., Bicout D.J., Sabatier P. *Aedes aegypti* survival and dengue transmission patterns in French Guiana. *J. Vector Ecol.*, 2006, vol. 31, no. 2, pp. 390–399. doi: 10.3376/1081-1710(2006)31[390:aasadt]2.0.co;2
10. Gan S.J., Leong Y.Q., Bin Barhanuddin M.F.H., Wong S.T., Wong S.F., Mak J.W., Ahmad R.B. Dengue fever and insecticide resistance in *Aedes* mosquitoes in Southeast Asia: a review. *Parasit. Vectors*, 2021, vol. 14, no. 1: 315. doi: 10.1186/s13071-021-04785-4
11. Hidayati L., Hadi U.K., Soviana S. Dengue hemorrhagic fever incidence in Sukabumi City according to climate condition. *Acta Vet. Indones.*, 2017, vol. 5, no. 1, pp. 22–28.
12. Hii Y.L., Rocklöv J., Ng N., Tang C.S., Pang F.Y., Sauerborn R. Climate variability and increase in intensity and magnitude of dengue incidence in Singapore. *Glob. Health Action*, 2009, no. 2. doi: 10.3402/gha.v2i0.2036
13. Indriani C., Ahmad R.A., Wiratama B.S., Arguni E., Supriyati E., Sasmono R.T., Kisworini F.Y., Ryan P.A., O'Neill S.L., Simmons C.P., Utarini A., Anders K.L. Baseline characterization of dengue epidemiology in Yogyakarta City, Indonesia, before a randomized controlled trial of wolbachia for arboviral disease control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2018, vol. 99, no. 5, pp. 1299–1307. doi: 10.4269/ajtmh.18-0315
14. Ishak N.I., Kasman K. The effect of climate factors for dengue hemorrhagic fever in Banjarmasin City, South Kalimantan Province, Indonesia, 2012–2016. *Public Heal. Indones.*, 2018, vol. 4, no. 3, pp. 121–128.
15. Islam S., Haque C.E., Hossain S., Hanesiak J. Climate variability, dengue vector abundance and dengue fever cases in Dhaka, Bangladesh: a time-series study. *Atmosphere (Basel)*, 2021, vol. 12, no. 7: 905. doi: 10.3390/atmos12070905
16. Jahan Y., Rahman A. Management of dengue hemorrhagic fever in a secondary level hospital in Bangladesh: a case report. *IDCases*, 2020, vol. 21: e00880. doi: 10.1016/j.idcr.2020.e00880
17. Johansson M.A., Dominici F., Glass G.E. Local and global effects of climate on dengue transmission in Puerto Rico. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2009, vol. 3, no. 2: e382. doi: 10.1371/journal.pntd.0000382
18. Kusnoputranto H., Sintorini M.M., Utomo S.W., Aliyyah E.R.K.S.N., Pratiwi O.A. Dynamic transmission of dengue hemorrhagic fever and climate variability patterns in Depok and Bogor. *Indian J. Public Health Res. Dev.*, 2020, vol. 11, no. 6, pp. 1263–1266.
19. Mekuriaw W., Kinde S., Kindu B., Mulualem Y., Hailu G., Gebresilassie A., Sisay C., Bekele F., Amare H., Wossen M., Woyessa A., Cross C.L., Messenger L.A. Epidemiological, entomological, and climatological investigation of the 2019 dengue fever outbreak in Gewane district, Afar region, North-East Ethiopia. *Insects*, 2022, vol. 13, no. 11: 1066. doi: 10.3390/insects13111066
20. Ministry of Health R.I. Indonesia's Health Profile in 2019. Ministry of Health R.I., 2020. URL: <https://www.kemkes.go.id/downloads/resources/download/pusdatin/profil-kesehatan-indonesia/Profil-Kesehatan-Indonesia-2019.pdf>
21. Monintja T.C.N., Arsin A.A., Amiruddin R., Syafar M. Analysis of temperature and humidity on dengue hemorrhagic fever in Manado Municipality. *Gac Sanit.*, 2021, vol. 35, suppl. 2, pp. S330–S333. doi: 10.1016/j.gaceta.2021.07.020
22. Nugraha F., Haryanto B., Wulandari R.A., Pakasi T.T. Ecological study of the relationship between dengue hemorrhagic fever (DHF) and climate factors in the administrative city of Central Jakarta, Indonesia, 1999–2018. *Jurnal Ilmu Kesehatan Masyarakat*, 2021, vol. 10, no. 3, pp. 142–148.
23. Reiner R.C. Jr., Stoddard S.T., Vazquez-Prokopec G.M., Astete H., Perkins T.A., Sihuinchu M., Stancil J.D., Smith D.L., Kochel T.J., Halsey E.S., Kitron U., Morrison A.C., Scott T.W. Estimating the impact of city-wide *Aedes aegypti* population control: an observational study in Iquitos, Peru. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2019, vol. 13, no. 5: e0007255. doi: 10.1371/journal.pntd.0007255
24. Ridha M.R., Indriyati L., Tomia A., Juhairiyah J. The effect of climate on the incidence of dengue hemorrhagic fever in the city of Ternate. *Spirakel*, 2019, vol. 11, no. 2, pp. 53–62
25. Saputro D.R.S., Widyaningsih Y., Widyaningsih P., Sutanto, Widiastuti. Spatio-temporal patterns of dengue hemorrhagic fever (DHF) cases with local indicator of spatial association (LISA) and cluster map at areas risk in Java-Bali Indonesia. *AIP Conference Proceedings*, 2021, vol. 2326, no. 1: 020027. doi: 10.1063/5.0040334
26. Sutriyawan A., Herdianti H., Cakranegara P.A., Lolani Y.P., Sinaga Y. Predictive index using receiver operating characteristic and trend analysis of dengue hemorrhagic fever incidence. *Open Access Maced J. Med. Sci.*, 2022, vol. 10, no. E, pp. 681–687. doi: 10.3889/oamjms.2022.8975
27. Simo Tchegnna H., Sado Yousseu F., Kamgang B., Tedjou A., McCall P.J., Wondji C.S. Concurrent circulation of dengue serotype 1, 2 and 3 among acute febrile patients in Cameroon. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2021, vol. 15, no. 10: e0009860. doi: 10.1371/journal.pntd.0009860
28. Thamrin Y., Pisaniello D., Guerin C., Rothmore P. Correlates of work-study conflict among international students in Australia: a multivariate analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2019, vol. 16, no. 15: 2695. doi: 10.3390/ijerph16152695
29. Tsuda Y., Takagi M. Survival and development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) larvae under a seasonally changing environment in Nagasaki, Japan. *Environ Entomol.*, 2021, vol. 30, no. 5, pp. 855–860. doi: 10.1603/0046-225X-30.5.855
30. Valdez L.D., Sibona G.J., Condat C.A. Impact of rainfall on *Aedes aegypti* populations. *Ecol. Modell.*, 2018, vol. 385, pp. 96–105. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2018.07.003
31. Widawati M., Fuadiyah M.E.A. Climate factors influence the incidence of dengue hemorrhagic fever in Cimahi City in 2004–2013. *Spirakel*, 2018, vol. 10, no. 2, pp. 86–96
32. Williams C.R., Mincham G., Ritchie S.A., Viennet E., Harley D. Bionomic response of *Aedes aegypti* to two future climate change scenarios in far north Queensland, Australia: implications for dengue outbreaks. *Parasit. Vectors*, 2014, vol. 7: 447. doi: 10.1186/1756-3305-7-447
33. Wirayoga M.A. Hubungan kejadian demam berdarah dengue dengan iklim di Kota Semarang tahun 2006–2011. *Unnes Journal of Public Health.*, 2013, vol. 2, no. 4, pp. 1–9.

34. Wiyono L., Rocha I.C.N., Cedeño T.D.D., Miranda A.V., Lucero-Prisco Iii D.E. Dengue and COVID-19 infections in the ASEAN region: a concurrent outbreak of viral diseases. *Epidemiol. Health*, 2021, vol. 43: e2021070. doi: 10.4178/epih.e2021070
35. Wu P.C., Guo H.R., Lung S.C., Lin C.Y., Su H.J. Weather as an effective predictor for occurrence of dengue fever in Taiwan. *Acta Trop.*, 2007, vol. 103, no. 1, pp. 50–57. doi: 10.1016/j.actatropica.2007.05.014
36. Xu H.Y., Fu X., Lee L.K., Ma S., Goh K.T., Wong J., Habibullah M.S., Lee G.K., Lim T.K., Tambyah P.A., Lim C.L., Ng L.C. Statistical modeling reveals the effect of absolute humidity on dengue in Singapore. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2014, vol. 8, no. 5: e2805. doi: 10.1371/journal.pntd.0002805
37. Xu L., Stige L.C., Chan K.S., Zhou J., Yang J., Sang S., Wang M., Yang Z., Yan Z., Jiang T., Lu L., Yue Y., Liu X., Lin H., Xu J., Liu Q., Stenseth N.C. Climate variation drives dengue dynamics. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2017, vol. 114, no. 1, pp. 113–118. doi: 10.1073/pnas.1618558114
38. Yang H.M., Macoris M.L., Galvani K.C., Andrighetti M.T., Wanderley D.M. Assessing the effects of temperature on the population of *Aedes aegypti*, the vector of dengue. *Epidemiol. Infect.*, 2009, vol. 137, no. 8, pp. 1188–1202. doi: 10.1017/S0950268809002040

Авторы:

Сутрияван А., магистр общественного здравоохранения, ассистент, Департамент общественного здравоохранения, Университет Бхакти Кенчана, Бандунг, Индонезия;
Курниати Н., магистр социологии, бакалавр общественного здравоохранения, магистр прикладного акушерства, ассистент, кафедра акушерства, Университет Бенгкулу, Бенгкулу, Индонезия;
Новианти, магистр социологии, магистр акушерства, ассистент, кафедра акушерства, Университет Бенгкулу, Бенгкулу, Индонезия;
Фарида У., к.м.н., магистр фармакологии, доцент, факультет фармации, Университет Аирлангга, Институт медицинских наук Бхакти Вията, Сурабая, Индонезия;
Юсанли Л., магистр социологии, магистр акушерства, ассистент, кафедра акушерства, Университет Бенгкулу, Бенгкулу, Индонезия;
Дестриани Ш.Н., магистр социологии, магистр акушерства, ассистент, кафедра акушерства, Университет Бенгкулу, Бенгкулу, Индонезия;
Сапутра М.Х.Ф., магистр сестринского дела, преподаватель, кафедра сестринского дела, Колледж медицинских наук Байтул Хикма, Бандар Лампунг, Индонезия.

Authors:

Sutriyawan A., SKM, MPH, Assistant Professor, Department of Public Health, Bhakti Kencana University, Bandung, Indonesia;
Kurniati N., S.ST., S.KM., M.Tr.Keb, Assistant Professor, Department of Midwifery, University of Bengkulu, Bengkulu, Indonesia;
Novianti, S.ST., M.Keb, Department of Midwifery, University of Bengkulu, Assistant Professor, Bengkulu, Indonesia;
Farida U., apt., M.Farm, Assistant Professor, Department of Pharmacy, Airlangga University, Bhakti Wiyata Institute of Health Sciences, Surabaya City, Indonesia;
Yusanti L., S.ST., M.Keb, Assistant Professor, Department of Midwifery, University of Bengkulu, Bengkulu, Indonesia;
Destriani S.N., S.ST., M.Keb, Assistant Professor, Department of Midwifery, University of Bengkulu, Bengkulu, Indonesia;
Saputra M.K.F., S.Kep., Ns., M.Kep, Lecturer, Department of Nursing, Baitul Hikmah College of Health Sciences, Bandar Lampung, Indonesia.

Поступила в редакцию 02.01.2023
 Отправлена на доработку 10.03.2023
 Принята к печати 05.03.2024

Received 02.01.2023
 Revision received 10.03.2023
 Accepted 05.03.2024

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОГРАММ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИЙ И ИНФЕКЦИОННОГО КОНТРОЛЯ В ПСИХОНЕВРОЛОГИЧЕСКИХ СТАЦИОНАРАХ АРМЕНИИ

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

ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения

Резюме. Цель исследования: дать характеристику внедрения и реализации основных компонентов профилактики инфекций и инфекционного контроля (ПИИК), определенных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), в психоневрологических стационарах Армении. *Материалы и методы.* Исследование было проведено за период с 2019 по 2022 г. во всех 8 психоневрологических стационарах Армении. Инструментом исследования служил переведенный на армянский язык опросник IPCAF (Infection Prevention and Control Assessment Framework), состоящий из 8 разделов. В соответствии с методологией оценки ВОЗ каждый возможный ответ на вопрос был оценен в баллах. Максимальная суммарная оценка по каждому основному компоненту могла составить 100 баллов, а итоговая оценка — 800. В ходе исследования была применена описательная эпидемиология. *Результаты.* Средняя итоговая оценка по всем компонентам IPCAF для всех психоневрологических стационаров Армении за весь период исследования повысилась в 1,46 раза (с $345,0 \pm 10,7$ баллов в 2019 г. до $502,5 \pm 32,5$ — в 2022; $p < 0,01$) и в 2022 г. характеризовалась как «промежуточный уровень». Анализ по отдельным основным компонентам (СС, Core component) ПИИК выявил, что максимальные средние оценки в 2022 г. были получены по компонентам СС2 (Руководство по ПИИК) — 81,6 баллов, СС8 (Создание безопасной среды в медицинских помещениях, а также материалы и оборудование для ПИИК) — 72,8 баллов, и СС5 (Мультимодальные стратегии) — 70,0 баллов. Наименьшие средние оценки были получены по ключевым компонентам: СС4 (Эпиднадзор за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи) — 45,0 балла, и по СС3 (Образование и профессиональная подготовка по ПИИК) — 56,3 баллов и СС7 (Рабочая нагрузка, укомплектованность персоналом и количество койко-мест) — 56,9 баллов. *Заключение.* В результате проведенного нами исследования впервые была показана возможность применения опросника IPCAF для оценки программ ПИИК в психоневрологических стационарах и выявления пробелов в различных областях ПИИК. Была получена информация о состоянии внедрения ключевых компонентов ПИИК в психоневрологических стационарах Армении. Анализ по отдельным основным компонентам позволил выявить пробелы, которые должны быть исправлены. Рекомендуется внедрение постоянного мониторинга за соблюдением различных аспектов ПИИК с целью недопущения ослабления контроля и ухудшения эпидемиологической ситуации.

Ключевые слова: профилактика инфекций и инфекционный контроль, характеристика, оценка, Армения, психоневрологический стационар, опросник, IPCAF.

Адрес для переписки:

Палозян Геннадий Овсепович
0025, Армения, Ереван, ул. Мхитара Гераци, 12,
Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний.
Тел.: +37412 80-80-83, 80-90-16 (служебн.); +374 94 22-56-10 (моб.).
E-mail: ncdc.palozyan@gmail.com

Contacts:

Gennady H. Palozyan
0025, Armenia, Yerevan, Mkhitar Heratsi str., 12,
National Center of Disease Control and Prevention.
Phone: +37412 80-80-83, 80-90-16 (office); +374 94 22-56-10 (mobile).
E-mail: ncdc.palozyan@gmail.com

Для цитирования:

Палозян Г.О., Аветисян Ш.М., Абовян Р.А., Мелик-Андреасян Г.Г.
Характеристика программ профилактики инфекций и инфекционного
контроля в психоневрологических стационарах Армении // Инфекция
и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 163–169. doi: 10.15789/2220-7619-
IPA-17610

Citation:

Palozyan G.H., Avetisyan Sh.M., Abovyan R.A., Melik-Andreasyan G.G.
Infection prevention and control programs in armenian psychoneurological
hospitals // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 163–169. doi: 10.15789/2220-7619-
IPA-17610

INFECTION PREVENTION AND CONTROL PROGRAMS IN ARMENIAN PSYCHONEUROLOGICAL HOSPITALS

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

National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Yerevan, Armenia

Abstract. Aim of the study: to characterize the integration and implementation of the main components of infection prevention and control (IPC), defined by the World Health Organization (WHO), in psychoneurological hospitals in Armenia. *Materials and methods.* The study was conducted over the period from 2019 to 2022 in all 8 psychoneurological hospitals in Armenia. The research tool was based on using the IPCAF (Infection Prevention and Control Assessment Framework) questionnaire translated into Armenian, consisting of 8 sections. In accordance with the WHO scoring methodology, each possible answer to the question was scored. The maximum total score for each core component could be 100 points, and the final score — 800. Descriptive epidemiology was used during the study. *Results.* The average final score for all IPCAF components for all neuropsychiatric hospitals in Armenia over the entire study period was increased by 1.46 times (from 345.0 ± 10.7 points in 2019 to 502.5 ± 32.5 in 2022; $p < 0.01$) and in 2022 was characterized as an “intermediate level”. Analysis by individual IPC core components (CC) found that the highest average scores in 2022 were obtained for components CC2 (IPC guidelines) — 81.6 points, CC8 (Built environment, materials and equipment for IPC at the facility level) — 72.8 points, and CC5 (Multimodal strategies) — 70.0 points. The lowest average scores were obtained for the key components: CC4 (Health care-associated infection (HAI) surveillance) — 45.0 points, and for CC3 (IPC education and training) — 56.3 points and CC7 (Workload, staffing and bed occupancy) — 56.9 points. *Conclusion.* Our study demonstrated for the first time an opportunity for using the IPCAF questionnaire to evaluate IPC programs in neuropsychiatric hospitals and identify gaps in various areas of IPC. Information was received regarding the state of key IPC component implementation in psychoneurological hospitals in Armenia. Analysis by individual core components identified gaps that need to be addressed. It is recommended to implement continuous monitoring of compliance with various aspects of IPC in order to prevent weakening of control and deterioration of epidemiological situation.

Key words: infection prevention and control (IPC), IPC program, evaluation, Armenia, psychoneurological hospital, questionnaire, IPCAF.

Введение

Неадекватная практика профилактики инфекций и инфекционного контроля (ПИИК) в медицинских учреждениях представляет собой одну из важных и актуальных проблем общественного здравоохранения во всем мире, являясь основной причиной роста показателей устойчивости к противомикробным препаратам (УПП) и инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [5, 6, 10, 11]. Тем не менее значительная часть ИСМП поддается профилактике. В литературе появляется все больше публикаций о глобальном бремени вреда, причиняемого этими инфекциями [4, 12], и стратегии по сокращению их распространения [13].

С целью совершенствования оценки, анализа и улучшения деятельности по ПИИК в каждом отдельном учреждении, ВОЗ разработала опросник «Механизм оценки профилактики и контроля инфекций» (IPCAF, Infection Prevention and Control Assessment Framework) [16], с помощью которого учреждение, отвечая на вопросы, касающиеся ПИИК, самостоятельно может определить сильные и слабые стороны.

Целый ряд проведенных исследований установил сильное различие реализации ключевых аспектов ПИИК не только между странами с разным уровнем доходов, но и внутри самих

стран [7, 8, 9, 14]. Особенно данное различие проявляется при оценке, проводимой на уровне отдельных учреждений.

Различные исследования, проведенные в Армении с 2019 г., показали, что передача ИСМП, а также внедрение ПИИК представляют собой серьезную проблему [1, 2, 3]. Проведенная Национальной командой по ПИИК большая работа по совершенствованию нормативно-правовой базы, а также оказанная методическая помощь учреждениям здравоохранения различного уровня по активному внедрению руководств и нормативно-правовых актов, касающихся различных аспектов ПИИК, позволили значительно улучшить оценку.

Опросник IPCAF первоначально был создан с целью оценки программ ПИИК в стационарах, оказывающих скорую медицинскую помощь. Однако аспекты ПИИК актуальны и для стационаров, оказывающих долговременную помощь. К таковым относятся, в первую очередь, психоневрологические стационары (ПНС), литературные данные о проведении подобных исследований в которых практически отсутствуют. В связи с этим целью нашей работы было описать текущее состояние реализации в стационарах Армении ключевых аспектов ПИИК, определенных основными компонентами ВОЗ, с использованием опросника IPCAF.

Материалы и методы

Исследование было проведено за период с 2019 по 2022 г. во всех 8 психоневрологических стационарах Армении. Инструментом исследования служил переведенный на армянский язык опросник IPCAF, включающий восемь основных компонентов (core component — CC), касающихся различных аспектов ПИИК:

- СС1: Программы профилактики инфекций и инфекционного контроля;
- СС2: Руководства по ПИИК;
- СС3: Образование и профессиональная подготовка по ПИИК;
- СС4: Эпиднадзор за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП);
- СС5: Мультимодальные стратегии для осуществления мероприятий по профилактике инфекций и инфекционному контролю;
- СС6: Мониторинг/проверка практической деятельности в области ПИИК, а также обратная связь и контроль;
- СС7: Рабочая нагрузка, укомплектованность персоналом и количество койко-мест на уровне учреждения;
- СС8: Создание безопасной среды в медицинских помещениях, а также материалы и оборудование для ПИИК на уровне учреждения [15].

В соответствии с методологией оценки ВОЗ каждый возможный ответ на вопрос был оценен в баллах. Баллы по отдельным вопросам были суммированы для каждого основного компонента, максимальная оценка за каждый основной компонент составляет 100 баллов. Окончательная оценка IPCAF была рассчитана путем сложения оценок всех восьми основных компонентов (то есть максимально возможное общее количество баллов составляло 800).

В зависимости от итоговой оценки программ ПИИК стационары были сгруппированы в четыре разные категории: 0–200 баллов — неадекватная, 201–400 баллов — основная (базовая), 401–600 баллов — средняя (промежуточная), 601–800 баллов — продвинутая.

Результаты опроса были занесены в электронную базу данных в MS Excel.

Таблица. Средние итоговые оценки ($M \pm m$) в период 2019–2022 гг.

Table. Average Total Score ($M \pm m$), 2019–2022

Год Year	Средняя итоговая оценка ($M \pm m$), баллы Average Total Score ($M \pm m$), points
2019	345,0 \pm 10,7
2020	450,3 \pm 34,1
2021	441,9 \pm 30,4
2022	502,5 \pm 32,5

Был проведен описательный анализ общей оценки IPCAF, а также оценок соответствующих основных компонентов и некоторых отдельных вопросов, представляющих особый интерес.

Статистический анализ данных проведен с использованием программного пакета MS Excel. Учитывая малое число стационаров, заключения были сделаны с «определенной осторожностью».

Результаты

При изучении динамики средней итоговой оценки по IPCAF было установлено, что в течение анализируемого периода времени данный показатель для всех ПНС страны вырос в 1,46 раза ($p < 0,01$): с 345,0 баллов в 2019 г. до 502,5 — в 2022 г. (табл.).

Анализ результатов в зависимости от расположения стационаров показал, что в период времени с 2019 по 2021 г. исследуемый показатель в столичных стационарах был выше, чем в региональных (рис. 1). Однако благодаря проведенной учебно-методической работе в 2022 г. оценки практически сравнялись.

Изучение динамики средних суммарных оценок по отдельным основным компонентам программ ПИИК в ПНС (рис. 2) показало, что в течение всего анализируемого периода времени указанные показатели выросли в 1,05–3,20 раза, за исключением основного компонента 7, по которому отмечено снижение в 1,03 раза (с 58,8 до 56,9 баллов).

Нами был проведен анализ по отдельным основным компонентам. Ответы на некоторые вопросы были оценены на соответствие мини-

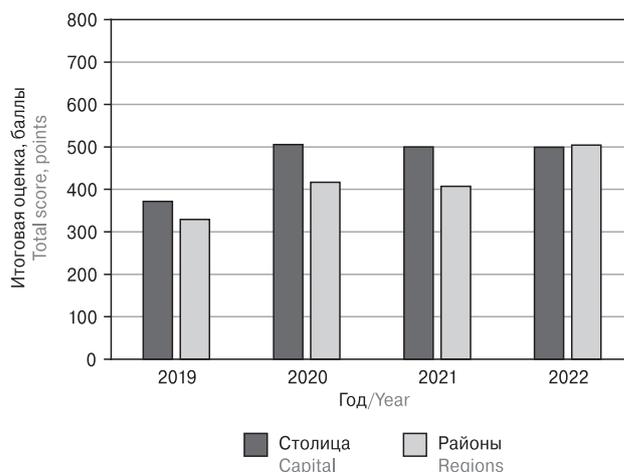


Рисунок 1. Средние итоговые оценки IPCAF за 2019–2022 гг. в зависимости от расположения ПНС

Figure 1. Average total IPCAF score by capital/regions in 2019–2022

мальным требованиям ВОЗ, предъявляемым к программам ПИИК стационаров первичного уровня медицинской помощи [17].

Основной компонент 1 (CC1)

Средняя суммарная оценка по основному компоненту 1 (Программа ПИИК) в течение анализируемого периода времени выросла в 1,9 раза (с 31,3 до 59,4 баллов). В соответствии с принятыми во время пандемии нормативно-правовыми актами в ПНС были разработаны программы ПИИК, созданы команды, отвечающие за реализацию ПИИК в стационаре, благодаря чему оценка значительно повысилась. Однако в стране имеется нехватка специалистов в области ПИИК, в связи с чем количество ПНС, в которых такие специалисты работают на полную ставку, осталось прежним. Имеющиеся же специалисты не имеют достаточного времени на деятельность по ПИИК. Тем не менее благодаря проделанной работе, число ПНС, соответствующих минимальным требованиям ВОЗ, предъявляемым к основному компоненту 1 программ ПИИК для стационаров первичного уровня, повысилось с 5 (62,5%) в 2019 г. до 7 (87,5%) в 2022 г.

Основной компонент 2 (CC2)

Средняя суммарная оценка по основному компоненту 2 в течение анализируемого периода времени выросла в 1,11 раз (с 73,8 до 81,6 баллов). Это обусловлено тем, что изначально оценка была достаточно высока, показывая максимальную среднюю суммарную оценку среди всех основных компонентов в 2019 г. (рис. 2). Кроме того, это был единственный основной компонент программы ПИИК, средняя сум-

марная оценка по которому, будучи максимальной в 2022 г., превысила порог в 80%.

Одновременно следует отметить, что по данному аспекту ПИИК не были хорошо выполнены минимальные требования ВОЗ, предъявляемые к программам ПИИК стационаров первичного уровня медицинской помощи. В течение анализируемого периода времени с 2019 по 2022 г. удельный вес ПНС, в которых CC2 соответствовал минимальным требованиям ВОЗ, повысился с 50 до 87,5%.

Основной компонент 3 (CC3)

Проведенный нами анализ по CC3 показал, что в ПНС страны в период до пандемии COVID-19 уделялось мало внимания обучению и подготовке кадров по вопросам ПИИК. Однако массовое обучение медицинских кадров в пандемийный период, а также введение обязательной аттестации для старшего и среднего медперсонала позволили повысить среднюю суммарную оценку по данному компоненту в 2,5 раза.

Тем не менее следует отметить, что тренинги проводились нерегулярно, часто ограничиваясь лишь вводным инструктажем и письменным/устным предоставлением информации без интерактивного обучения у постели больного. Специальная подготовка по ПИИК для пациентов или членов их семей с целью минимизации риска ИСМП осуществлялась лишь в 1 (12,5%) ПНС.

Благодаря проведенным мероприятиям средняя суммарная оценка по основному компоненту 3 в 2022 г. достигла уровня всего лишь в 56,3 балла, хотя к 2022 г. удалось достигнуть выполнения минимальных требований ВОЗ во всех исследуемых ПНС.

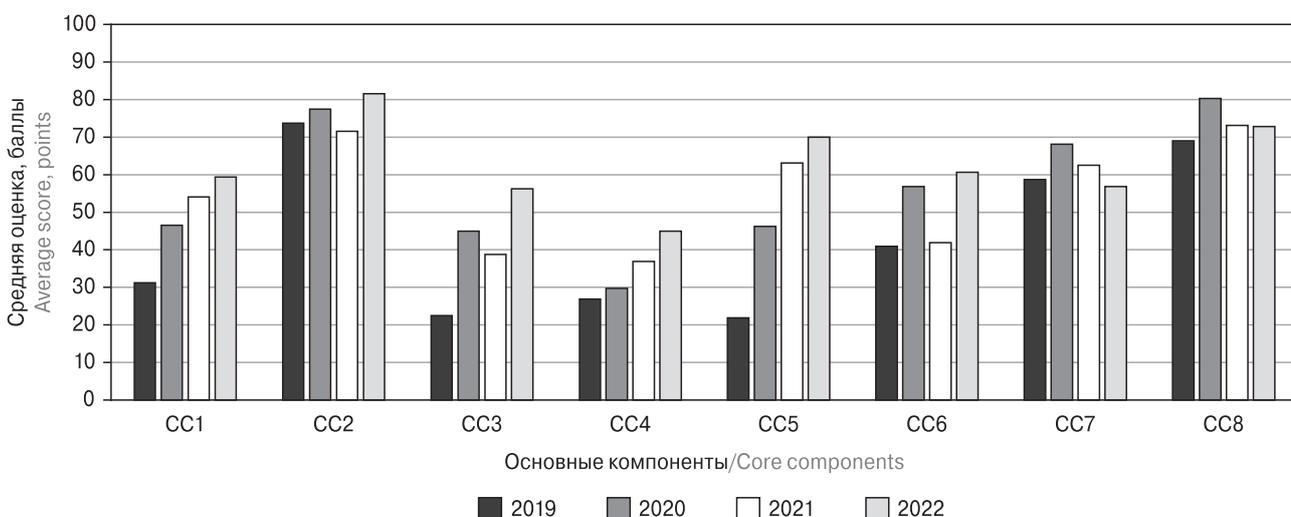


Рисунок 2. Средние суммарные оценки по отдельным основным компонентам программ ПИИК в ПНС в 2019–2022 гг.

Figure 2. Average scores for IPCAF core components in 2019–2022

Основной компонент 4 (СС4)

Одни из самых низких средних суммарных оценок были получены по основному компоненту 4, изучающему вопросы эпиднадзора за ИСМП. Данный показатель за изучаемый период времени вырос всего в 1,67 раза (с 26,9 до 45,0). Это было обусловлено тем, что специалисты, отвечающие за эпиднадзор, прошли подготовку по основам эпидемиологии, эпиднадзора и ПИИК лишь в половине ПНС. Определение приоритетов, а также сам эпиднадзор за отдельными видами ИСМП ведутся лишь в 25–37,5% ПНС. Стандартизированные методы сбора данных в 2022 г. использовались лишь в 3 (37,5%) ПНС, а инструменты для регулярной проверки качества данных, а также достаточный лабораторный потенциал для проведения эпиднадзора — лишь в 2 (25%). В большинстве ПНС не обеспечивается система обратной связи.

Основной компонент 5 (СС5)

Средняя суммарная оценка по СС5 в ПНС, как и в других видах стационаров страны, в 2019 г. была очень низкой — всего 21,9 баллов, что было обусловлено низким уровнем знаний в области мультимодальных стратегий. Однако после проведенной учебно-методической работы данный показатель вырос в 3,2 раза, достигнув отметки в 70 баллов.

Удельный вес ПНС, использующих мультимодальные стратегии внедрения мероприятий ПИИК, в период с 2019 по 2021 г. повысился с 50 до 100%, хотя в 2022 г. снизился до 75%. Если в 2019 г. мультимодальные стратегии включали все 5 элементов примерно в половине ПНС, то в 2022 г. — уже практически во всех, пусть и не в полной мере. Для реализации мультимодальных стратегий ПИИК используется мультидисциплинарная группа специалистов в 7 (87,5%) ПНС, однако при этом применяются чек-листы для мониторинга внедрения стратегий ПИИК лишь в 1 (12,5%) ПНС. Тем не менее удельный вес ПНС, в которых мультимодальные стратегии внедрения мероприятий ПИИК соответствуют минимальным требованиям ВОЗ, в течение изучаемого периода времени соблюдался во всех ПНС.

Основной компонент 6 (СС6)

Проведенный нами анализ по СС6 (Мониторинг/аудит практик ПИИК и обратная связь) показал, что средняя суммарная оценка по всем ПНС страны в течение анализируемого периода времени выросла в 1,48 раза (с 40,9 до 60,6 баллов). Так, в 5 (62,5%) ПНС появился обученный персонал, ответственный за мониторинг/аудит практики и обратную связь ПИИК, которого не было на момент начала

исследования. Количество ПНС с планом мониторинга с четкими целями, задачами и мероприятиями (включая инструменты для систематического сбора данных) увеличилось с 3 (37,5%) в 2019 г. до 5 (62,5%) в 2022 г. Тем не менее в более чем половине ПНС страны не применяется Инструмент по самооценке гигиены рук ВОЗ, что, по-видимому, связано с отсутствием соответствующего нормативно-правового акта, утвержденного приказом МЗ РА.

Была налажена также система обратной связи по состоянию деятельности/выполнении ПИИК. Так, число ПНС, не предоставляющих отчетов по аудитам в сфере ПИИК, сократилось с 4 (50%) в 2019 г. до 1 (12,5%) в 2022 г. Однако данные отчеты предоставлялись лишь руководству больницы, но не предоставлялись комиссии ПИИК, а также персоналу, работающему непосредственно с пациентами. В более чем половине (62,5%) ПНС указанные данные мониторинга представляются регулярно (по крайней мере ежегодно).

Следует отметить, что практически все ПНС страны в течение анализируемого периода времени соответствовали минимальным требованиям ВОЗ, предъявляемым к СС6.

Основной компонент 7 (СС7)

Средняя суммарная оценка по основному компоненту 7 (Рабочая нагрузка, кадровое обеспечение и средняя занятость койки) в начале анализируемого периода времени выросла с 58,8 баллов в 2019 г. до 68,1 в 2020 г., после чего постепенно снизилась до 56,9 баллов в 2022 г. Отчасти это было обусловлено некоторым усилением кадрового потенциала в период пандемии COVID-19 в 2020 г. с последующим его ослаблением. Показатели средней занятости койки в большинстве ПНС страны также соответствовали рекомендуемым нормативам. Следует отметить, что практически все ПНС страны в течение анализируемого периода времени соответствовали минимальным требованиям ВОЗ, предъявляемым к СС7.

Основной компонент 8 (СС8)

Анализ, проведенный по основному компоненту 8 (Рабочая среда, материалы и оборудование для ПИИК) показал, что средняя суммарная оценка по всем ПНС страны в течение анализируемого периода времени выросла с 69,1 до 72,8 баллов.

Водоснабжение в среднем ≥ 5 дней в неделю или каждый день, а также бесперебойный пункт безопасной питьевой воды были доступны практически во всех ПНС.

Число ПНС с действующими зонами гигиены рук (наличие спиртосодержащего жидкого антисептика или мыла, воды и чистых одно-

разовых полотенец) во всех местах оказания медицинской помощи/ухода за пациентами увеличилось с 75% в 2019 г. до 100% в 2022 г. Практически во всех ПНС имеется достаточное количество туалетов (≥ 1 на 20 стационарных пациентов).

Более трех/четвертей (87,5%) ПНС имеют достаточное энергообеспечение в дневное и ночное время, а также вентиляцию (естественную или искусственную). Практически во всех ПНС имеются в наличии соответствующие средства и принадлежности для уборки (например, моющие средства, швабры, ведра и т. д.).

7 из 8 ПНС имеют одноместные палаты или палаты для когортной изоляции пациентов с идентичными возбудителями (в случае необходимости). Практически все ПНС имеют средства индивидуальной защиты, однако 3 стационара указали на их недостаточное количество.

Практически все ПНС осуществляют правильную сортировку и утилизацию разных видов медицинских отходов.

Следует отметить, что в течение анализируемого периода времени удельный вес ПНС, в которых СС8 соответствовал минимальным требованиям ВОЗ, повысился в 2 раза: с 50 до 100%.

Обсуждение

В результате проведенного исследования впервые была показана возможность применения опросника IPCAF для оценки программ ПИИК в психоневрологических стационарах и выявления пробелов в различных областях ПИИК. Была получена информация о состоянии внедрения ключевых компонентов ПИИК в психоневрологических стационарах Армении. Средняя итоговая оценка по всем компонентам IPCAF в 2022 г. составила 502,5 балла, которая на данный момент характеризовалась как «промежуточный» уровень [16].

Анализ по отдельным основным компонентам показал, что, несмотря на высокие показатели соответствия минимальным требованиям ВОЗ, предъявляемым к большинству основных компонентов программ ПИИК, все еще имеются достаточные пробелы, которые должны быть исправлены. Кроме того, колебания оценок в течение анализируемого периода времени указывают на необходимость постоянного мониторинга за соблюдением различных аспектов ПИИК с целью недопущения ослабления контроля и ухудшения эпидемиологической ситуации.

Список литературы/References

1. Палозян Г.О. Оценка программ профилактики инфекций и инфекционного контроля в стационарах Армении в 2019 году с помощью международного инструмента IPCAF // Медицинская наука Армении. 2022. № 4. С. 86–93. [Palozyan G. Evaluation of IPC programs in Armenian hospitals in 2019 with IPCAF tool. *Meditsinskaya nauka Armenii = Medical Science of Armenia*, 2022, no. 4, pp. 86–93.] doi: 10.54503/0514-7484-2022-62.4-86
2. Палозян Г.О., Аветисян Ш.М., Абовян Р.А., Мелик-Андреасян Г.Г., Ванян А.В. Оценка внедрения программ профилактики и инфекционного контроля в стационарах Армении на фоне пандемии COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1149–1155. [Palozyan G.H., Avetisyan Sh.M., Abovyan R.A., Melik-Andreasyan G.G., Vanyan A.V. Assessing implementation of prevention and infection control programs in armenian hospitals during the COVID-19 pandemic. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1149–1155. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-AIO-2044
3. Палозян Г.О., Аветисян Ш.М., Абовян Р.А., Мелик-Андреасян Г.Г., Ванян А.В. Оценка программ профилактики инфекций и инфекционного контроля в стационарах Армении в 2019–2021 гг. // Материалы V съезда эпидемиологов, медицинских микробиологов и паразитологов Армении (с международным участием). Ереван, 2022. С. 90–94. [Palozyan G., Avetisyan Sh., Abovyan R., Melik-Andreasyan G., Vanyan A. Evaluation of IPC programs in Armenian hospitals in 2019–2021. Materials of 5th Congress of epidemiologists, medical microbiologists and parasitologists of Armenia (with international participation). *Yerevan*, 2022, pp. 90–94.]
4. Allegranzi B., Bagheri Nejad S., Combescure C., Graafmans W., Attar H., Donaldson L., Pittet D. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 2011, vol. 377, no. 9761, pp. 228–241. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61458-4
5. Alp E., Damani N. Healthcare-associated infections in intensive care units: epidemiology and infection control in low-to-middle income countries. *J. Infect. Dev. Ctries*, 2015, vol. 9, no. 10, pp. 1040–1045. doi: 10.3855/jidc.6832
6. Cosgrove S.E. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin. Infect. Dis.*, 2006, vol. 42, suppl. 2, pp. S82–S89. doi: 10.1086/499406
7. Dickstein Y., Nir-Paz R., Pulcini C., Cookson B., Beović B., Tacconelli E., Nathwani D., Vatcheva-Dobrevska R., Rodríguez-Baño J., Hell M., Saenz H., Leibovici L., Paul M. Staffing for infectious diseases, clinical microbiology and infection control in hospitals in 2015: results of an ESCMID member survey. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2016, vol. 22, no. 9, pp. 812.e9–812.e17. doi: 10.1016/j.cmi.2016.06.014
8. Hansen S., Schwab F., Gropmann A., Behnke M., Gastmeier P.; PROHIBIT Consortium. [Infection control and safety culture in German hospitals (In German)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2016, vol. 59, no. 7, pp. 908–915. doi: 10.1007/s00103-016-2373-0
9. Hansen S., Zingg W., Ahmad R., Kyratsis Y., Behnke M., Schwab F., Pittet D., Gastmeier P.; PROHIBIT study group. Organization of infection control in European hospitals. *J. Hosp. Infect.*, 2015, vol. 91, no. 4, pp. 338–345. doi: 10.1016/j.jhin.2015.07.011
10. Laxminarayan R., Duse A., Wattal C., Zaidi A.K., Wertheim H.F., Sumpradit N., Vlieghe E., Hara G.L., Gould I.M., Goossens H., Greko C., So A.D., Bigdeli M., Tomson G., Woodhouse W., Ombaka E., Peralta A.Q., Qamar F.N., Mir F.,

- Kariuki S., Bhutta Z.A., Coates A., Bergstrom R., Wright G.D., Brown E.D., Cars O. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.*, 2013, vol. 13, no. 12, pp. 1057–1098. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9
11. Mehrad B., Clark N.M., Zhanel G.G., Lynch J.P. 3rd. Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. *Chest*, 2015, vol. 147, no. 5, pp. 1413–1421. doi: 10.1378/chest.14-2171
 12. Report on the endemic burden of healthcare-associated infection worldwide. Geneva: World Health Organization, 2011. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80135/1/9789241501507_eng.pdf (18.08.2021)
 13. Shekelle P.G., Pronovost P.J., Wachter R.M., McDonald K.M., Schoelles K., Dy S.M., Shojania K., Reston J.T., Adams A.S., Angood P.B., Bates D.W., Bickman L., Carayon P., Donaldson L., Duan N., Farley D.O., Greenhalgh T., Haughom J.L., Lake E., Lilford R., Lohr K.N., Meyer G.S., Miller M.R., Neuhauser D.V., Ryan G., Saint S., Shortell S.M., Stevens D.P., Walshe K. The top patient safety strategies that can be encouraged for adoption now. *Ann. Intern. Med.*, 2013, vol. 158, no. 5, pt 2, pp. 365–368. doi: 10.7326/0003-4819-158-5-201303051-00001
 14. Struelens M.J., Wagner D., Bruce J., MacKenzie F.M., Cookson B.D., Voss A., van den Broek P.J., Gould I.M.; ARPAC Steering Group. Status of infection control policies and organisation in European hospitals, 2001: the ARPAC study. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2006, vol. 12, no. 8, pp. 729–737. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01462.x
 15. WHO. Guidelines on Core components of Infection Prevention and control Programmes at the national and acute health care facility level. World Health Organization. 2016. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/251730/9789241549929-eng.pdf?sequence=1> (27.02.2019)
 16. WHO. Infection Prevention and Control Assessment Framework. World Health Organization. 2018. URL: <https://www.who.int/infection-prevention/tools/core-components/IPCAF-facility.pdf> (27.02.2019)
 17. WHO. Minimum requirements for infection prevention and control programmes. 2019. URL: <https://www.who.int/publications/item/9789241516945>

Авторы:

Палозян Г.О., врач-эпидемиолог отдела эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения;

Аветисян Ш.М., врач-эпидемиолог отдела эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения;

Абовян Р.А., начальник отдела эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения;

Мелик-Андреасян Г.Г., д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, филиал «Референс-лабораторный центр», Ереван, Армения.

Authors:

Palozyan G.H., Epidemiologist, Department of Epidemiology of Communicable and Non-Communicable Diseases, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Yerevan, Armenia;

Avetisyan Sh.M., Epidemiologist, Department of Epidemiology of Communicable and Non-Communicable Diseases, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Yerevan, Armenia;

Abovyan R.A., Head of the Department of Epidemiology of Communicable and Non-Communicable Diseases, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Yerevan, Armenia;

Melik-Andreasyan G.G., DSc (Medicine), Professor, Deputy-Director for Scientific Work, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, “Referens Laboratory Center” Branch, Yerevan, Armenia.

Поступила в редакцию 26.02.2024
Принята к печати 21.03.2024

Received 26.02.2024
Accepted 21.03.2024

ХАРАКТЕРИСТИКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *ACINETOBACTER BAUMANNII* bv. *TRYPTOPHANDESTRUENS* И *ACINETOBACTER* *BAUMANNII*

Е.П. Сиволодский^{1,2}, Л.А. Краева^{1,2}, Е.В. Мельникова¹, Г.В. Горелова¹

¹ ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Цель исследования — определить особенности чувствительности бактерий биовара *Acinetobacter baumannii* bv. *tryptophandestrans* к антимикробным препаратам, используемым для лечения ацинетобактерной инфекции. Объектом исследования были 86 первичных клинических изолятов *A. baumannii*, из них 34 штамма *A. baumannii* bv. *tryptophandestrans*, выделенных в микробиологической лаборатории Военно-медицинской академии в 2021–2022 гг. Видовую идентификацию бактерий осуществляли методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. Биовар *tryptophandestrans* *A. baumannii* определяли на плотной хромогенной среде с 0,1% антралиновой кислоты или 0,1% бензоата натрия по появлению через 18–24 ч инкубации посева при 37°C зон темно-коричневой окраски питательной среды вокруг газонов бактерий. Чувствительность изолятов *A. baumannii* к антимикробным препаратам (АМП) определяли на микробиологическом анализаторе «Vitek 2 compact» (bioMérieux, Франция). Клинические категории чувствительности изолятов к АМП (Ч) выявляли на основании пограничных значений минимальных подавляющих концентраций (МПК, мг/л) установленных Европейским комитетом по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST), версия 11.0. Ввиду отсутствия критерия EUCAST для тигециклина, изучали чувствительность штаммов к тигециклину, оценивая распределение штаммов по МПК, МПК50%, МПК90%. Результаты сравнительной характеристики группы изолятов *A. baumannii* bv. *tryptophandestrans* и группы изолятов прочих *A. baumannii* по клинической категории чувствительных к АМП (Ч) показали, что очень редко в обеих группах присутствуют штаммы, чувствительные к меропенему (8,8±4,6 и 3,8±2,6% соответственно, $p > 0,05$), ципрофлоксацину (5,8±4,0%; 9,6±4,1%, $p > 0,05$). Редко представлены в обеих группах штаммы, чувствительные к гентамицину (26,7±7,55%; 19,3±5,5%, $p > 0,05$); триметоприм/сульфаметоксазолу (38,8±8,3%; 23,6±5,3%, $p > 0,05$). Сохранили чувствительность к полимиксину В все штаммы обеих групп (100%). Штаммы группы биовара *A. baumannii* bv. *tryptophandestrans* превосходят штаммы группы прочих *A. baumannii* по частоте изолятов с МПК50% тигециклина (МПК50% — 0,5 мг/л; МПК50% — 2 мг/л соответственно), а также имеют достоверно больше штаммов с МПК 0,5 мг/л (52,9 и 15,4% соответственно, $p < 0,01$). Таким образом, клинические изоляты биовара *A. baumannii* bv. *tryptophandestrans* не имеют достоверных различий с изолятами прочих штаммов *A. baumannii*

Адрес для переписки:

Краева Людмила Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-94-85. Факс: 8 (812) 498-09-39.
E-mail: lykraeva@yandex.ru

Contacts:

Lydmila A. Kraeva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-94-85. Fax: +7 (812) 498-09-39.
E-mail: lykraeva@yandex.ru

Для цитирования:

Сиволодский Е.П., Краева Л.А., Мельникова Е.В., Горелова Г.В.
Характеристика чувствительности к антибиотикам клинических
изолятов *Acinetobacter baumannii* bv. *tryptophandestrans*
и *Acinetobacter baumannii* // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1.
С. 170–174. doi: 10.15789/2220-7619-COA-17521

Citation:

Sivolodskii E.P., Kraeva L.A., Melnicova E.V., Gorelova G.V. Characteristics
of antibiotic sensitivity of *Acinetobacter baumannii* bv. *tryptophandestrans*
and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 170–174.
doi: 10.15789/2220-7619-COA-17521

по частоте встречаемости штаммов, чувствительных (Ч) к меропенему, ципрофлоксацину, гентамицину, триметоприм/сульфаметоксазолу, полимиксину В, но отличаются по показателям чувствительности к тигециклину — более высокой частотой штаммов с МПК 0,5 мг/л ($p < 0,01$) и МПК50%.

Ключевые слова: *Acinetobacter baumannii*, биовар, *Acinetobacter baumannii* bv. *tryptophandestrueus*, чувствительность к антимикробным препаратам, тигециклин, антралиловая кислота, бензоат натрия.

CHARACTERISTICS OF ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF ACINETOBACTER BAUMANNII BV. TRYPTOPHANDESTRUENS AND ACINETOBACTER BAUMANNII CLINICAL ISOLATES

Sivolodskii E.P.^{a,b}, Kraeva L.A.^{a,b}, Melnicova E.V.^a, Gorelova G.V.^a

^a Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. The aim of the study was to determine the sensitivity of the bacteria of the biovar *Acinetobacter baumannii* bv. *tryptophandestrueus* to antibiotics used to treat *Acinetobacter*-infection. The object of the study was 86 primary clinical isolates of *A. baumannii*, of which 34 strains of *A. baumannii* bv. *tryptophandestrueus* isolated in the microbiological laboratory of the Military Medical Academy in 2021–2022. Species identification of bacteria was carried out by MALDI-ToF mass spectrometry. The biovar *tryptophandestrueus* of *A. baumannii* was determined on a dense chromogenic medium. The sensitivity of *A. baumannii* isolates to antibiotics was determined by a “Vitek 2 compact” microbiological analyzer (bioMérieux, France). Clinical categories of isolates sensitivity to antibiotics (S) were identified based on the boundary values of minimum suppressive concentrations (MSC, mg/L) established by the European Committee for the Determination of Sensitivity to Antimicrobial Preparates (EUCAST), version 11.0. Isolates of *A. baumannii* bv. *tryptophandestrueus* and groups of isolates of other *A. baumannii* very rarely sensitive to meropenem ($8.8 \pm 4.6\%$; $3.8 \pm 2.6\%$, respectively, $p > 0.05$), ciprofloxacin ($5.8 \pm 4.0\%$; $9.6 \pm 4.1\%$, $p > 0.05$). Strains sensitive to gentamicin are rarely represented in both groups ($26.7 \pm 7.55\%$; $19.3 \pm 5.5\%$, $p > 0.05$) trimethoprim/sulfamethoxazole ($38.8 \pm 8.3\%$; $23.6 \pm 5.3\%$, $p > 0.05$). Sensitivity to polymyxin B was preserved in all strains of both groups (100%). Strains of the tryptophandestrueus biovar *A. baumannii* group surpass strains of the other strain of *A. baumannii* group in the frequency of isolates with MSC50% tigecycline (MSC50% — 0.5 mg/l; MSC50% — 2 mg/l, respectively), and also have significantly more strains with MSC 0.5 mg/l (52.9% and 15.4%, respectively, $p < 0.01$). Thus, the clinical isolates of the biovar *A. baumannii* bv. *tryptophandestrueus* have no significant differences with isolates of other strains of *A. baumannii* in the frequency of strains sensitive (S) to meropenem, ciprofloxacin, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole, polymyxin B, but they differ in terms of sensitivity to tigecycline — a higher frequency of strains with an MSC of 0.5 mg/l ($p < 0.01$) and an MSC of 50%.

Key words: *acinetobacter baumannii*, biovar, *Acinetobacter baumannii* bv. *tryptophandestrueus*, sensitivity to antimicrobial drugs, tigecycline, anthranilic acid, sodium benzoate.

Введение

В 2019 г. нами были выделены клинические изоляты биовара *A. baumannii* bv. *tryptophandestrueus*, которые осуществляли хромогенную трансформацию L-триптофана и антралиловой кислоты необычным «антралилатным» путем [3]. Последующие исследования показали значительную распространенность этого биовара среди клинических изолятов *A. baumannii* [2]. Учитывая значение *A. baumannii* как ведущего возбудителя нозокомиальных и раневых инфекций, а также их экстремальную антибиотикорезистентность, представляет интерес получение сведений о чувствительности к антимикробным препаратам их биовара *tryptophandestrueus*.

Цель исследования — определить особенности чувствительности бактерий биовара *A. baumannii* bv. *tryptophandestrueus* к антимикробным препаратам, используемым для лечения ацинетобактерной инфекции.

Материалы и методы

Штаммы бактерий. Исследовали 86 первичных клинических штаммов *A. baumannii*, из них 34 штамма *A. baumannii* bv. *tryptophandestrueus*, выделенных в микробиологической лаборатории Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова в 2021–2022 гг. Видовую принадлежность всех штаммов подтверждали методом MALDI-ToF масс-спектрометрии в Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова и НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Указанные штаммы находятся в рабочей коллекции культур бактерий Е.П. Сиволодского на кафедре микробиологии Военно-медицинской академии.

Питательные среды и реактивы. Для культивирования бактерий применяли Колумбийский агар (НИЦФ, Санкт-Петербург) и Колумбийский агар с 5% крови овец.

Идентификация видов бактерий методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. Использовали масс-спектрометр «VastoSCREEN MALDI-ToF»

(Литех, Россия) и/или настольный MALDI-ToF масс-спектрометр с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc., Германия) в соответствии с инструкциями по применению.

Идентификация бактерий биовара *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* по хромогенной биотрансформации бензоата натрия или антраниловой кислоты [2, 3]. Состав и приготовление питательной среды: в 1 л дистиллированной воды вносят: пептон ферментативный 5,0 г; NaCl 5,0 г; $\text{FCl}_3\text{6H}_2\text{O}$ 10%-ный водный раствор 0,5 мл; бромтимоловый синий 1,6%-ный водный раствор 3 мл; агар микробиологический 15,0 г; NaOH 4% раствор 2,8 мл (для среды с бензоатом натрия) или 25 мл (для среды с антраниловой кислотой); растворяют при нагревании все компоненты, затем добавляют бензоат натрия 1,0 г (или антраниловую кислоту 1,0 г); корректируют pH $7,2 \pm 0,2$; стерилизуют при 112°C в течение 20 мин, разливают в чашки Петри. Питательная среда имеет зеленую окраску, прозрачная, пригодна к использованию в течение 30 суток при хранении от 4 до 8°C . Контроль питательной среды при приготовлении: суточные культуры контрольных штаммов (клинические штаммы *A. baumannii* и *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens*) засевают в виде бляшки диаметром 5 мм на питательную среду в чашке, инкубируют при 37°C в течение 18–24 ч, учитывают результат: питательная среда пригодна к использованию, если вокруг газона бактерий *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* имеется зона темно-коричневой окраски среды (положительный контроль) при отсутствии зоны окраски среды вокруг газона *A. baumannii* (отрицательный контроль).

Применение питательной среды. Исследуемый материал — суточные культуры *A. baumannii* засевают на питательную среду в виде бляшек в отдельных секторах чашки ($1/8$ часть чашки), инкубируют аэробно при 37°C 18–24 ч, затем учитывают результат. Наличие вокруг газона бактерий зоны темно-коричневой окраски питательной среды указывает на принадлежность штамма к биовару *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens*.

Определение чувствительности бактерий к антимикробным препаратам (АМП). Чувствительность к АМП изолятов *A. baumannii* определяли сразу после их видовой идентификации. Исследование проводили автоматизированным микробиологическим анализатором «Vitek 2 compact» (bioMerieux, Франция) в соответствии с инструкцией по применению. Клинические категории чувствительности изолятов к АМП определяли на основании пограничных значений минимальных подавляющих концентраций (МПК мг/л), установлен-

ных Европейским комитетом по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST), версия 11.0, и российских рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», версия 11.0, 2011.01 [1]. На приборе «Vitek 2 compact» определяли результаты тестирования штаммов *A. baumannii* к АМП по категориям чувствительности (Ч) и резистентности (Р), используя следующие критерии пограничных значений МПК мг/л: меропенем (Ч ≤ 2 ; Р > 8), ципрофлоксацин (Ч $\leq 0,001$; Р > 1), гентамицин (Ч ≤ 4 ; Р > 4), полимиксин В (Ч ≤ 2 ; Р > 2), триметоприм/сульфаметоксазол (Ч ≤ 20 по триметоприму). Отсутствует критерий EUCAST по определению клинической категории чувствительности бактерий *Acinetobacter* spp. к тигециклину. Поэтому для сравнительной характеристики штаммов *A. baumannii* и *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* по чувствительности к тигециклину оценивали распределение штаммов по МПК, МПК50%, МПК90%.

Результаты

Результаты сравнительной характеристики группы изолятов *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* и группы изолятов прочих *A. baumannii* по клинической категории чувствительных к антимикробным препаратам (Ч), определенной на основании критериев пороговых МПК мг/л по EUCAST, версия 11.0 [1], приведены в табл. 1.

Результаты сравнительной характеристики чувствительности к тигециклину группы изолятов *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* и группы изолятов прочих *A. baumannii*, определенной методом их распределения по МПК, МПК50%, МПК90% представлены в табл. 2.

Обсуждение

Установлено, что в группе изолятов *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* и группе изолятов прочих *A. baumannii* очень редко присутствуют штаммы, чувствительные (Ч) к меропенему ($8,8 \pm 4,6$ и $3,8 \pm 2,6\%$ соответственно, $p > 0,05$) и ципрофлоксацину ($5,8 \pm 4,0$ и $9,6 \pm 4,1\%$ соответственно, $p > 0,05$). Редко представлены в обеих группах штаммы, чувствительные к гентамицину ($26,7 \pm 7,5$ и $19,3 \pm 5,5\%$ соответственно, $p > 0,05$) и триметоприм/сульфаметоксазолу ($36,8 \pm 8,3$ и $23,6 \pm 5,3\%$ соответственно, $p > 0,05$). Сохранили чувствительность к полимиксину В все штаммы обеих групп (по 100%).

Выявлена особенность чувствительности к антимикробным препаратам бактерий биовара *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens*: они пре-

восходят штаммы группы прочих *A. baumannii* по частоте изолятов с МПК 50% тигециклина (МПК 50% – 0,5 мг/л; МПК 50% – 2 мг/л соответственно), а также имеют достоверно больше штаммов с МПК 0,5 мг/л (52,9 и 15,4% соответственно, $p < 0,01$).

Результаты исследования могут быть использованы при выборе антимикробных препаратов для эмпирической химиотерапии инфекций, вызываемых *A. baumannii*, а также для разработки критериев определения клинической категории чувствительности *A. baumannii* к тигециклину по пороговой МПК.

Заключение

Таким образом, клинические изоляты биофарма *A. baumannii* *bv. tryptophandestrans* не имеют достоверных различий с изолятами прочих *A. baumannii* по частоте штаммов, чувствительных (Ч) к меропенему, ципрофлоксацину, гентамицину, триметоприм/сульфаметоксазолу, полимиксину В. Бактерии биофарма *A. baumannii* *bv. tryptophandestrans* отличаются от изолятов прочих *A. baumannii* показателями чувствительности к тигециклину — более высокой частотой штаммов с МПК 0,5 мг/л ($p < 0,01$) и МПК 50%.

Таблица 1. Характеристика чувствительности к антибиотикам клинических штаммов *Acinetobacter baumannii* *bv. tryptophandestrans* и *A. baumannii**

Table 1. Characteristics of antibiotic sensitivity of clinical strains of *Acinetobacter baumannii* *bv. tryptophandestrans* and *A. baumannii**

Антибиотики Antibiotics	Штаммы <i>A. baumannii</i> <i>bv. tryptophandestrans</i> Strains of <i>A. baumannii</i> <i>bv. tryptophandestrans</i> n = 34	Штаммы <i>A. baumannii</i> Strains of <i>A. baumannii</i> n = 52	Уровни вероятностей различий M1 и M2 (P) M1 and M2 (P) difference probability level
	Из них чувствительных к антибиотикам (Ч)** From them sensitive to antibiotics (S)** N ₁ ; M ₁ ± m ₁ %	Из них чувствительных к антибиотикам (Ч)** From them sensitive to antibiotics (S)** N ₂ ; M ₂ ± m ₂ %	
Меропенем Meropenem	3; 8,8±4,8	3,8 ± 2,6	> 0,05
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	2; 5,8±4,0	5; 9,6±4,1	> 0,05
Гентамицин Gentamicin	9; 26,7±7,5	10; 19,3±5,5	> 0,05
Триметоприм/ сульфаметоксазол Trimethoprim/ sulfamethoxazole	13; 38,2±8,3	23,1±5,8	> 0,05
Полимиксин В Polymyxin B	34; 100	52; 100	0

Примечание. * — чувствительность к антибиотикам определяли микробиологическим анализатором «Vitek 2 compact» (bioMerieux, Франция). ** — клиническую категорию чувствительных к антимикробным препаратам штаммов (Ч) определяли по пороговым значениям МПК, установленным EUCAST, версия 11.0 [1].

Note. * — sensitivity to antibiotics was determined by the «Vitek 2 compact» microbiological analyzer (bioMerieux, France). ** — the clinical category of antimicrobial-sensitive strains (S) was determined by the boundary MSC values established by EUCAST version 11.0 [1].

Таблица 2. Чувствительность к тигециклину клинических изолятов *Acinetobacter baumannii* *bv. tryptophandestrans* и *A. baumannii*

Table 2. Tigecycline sensitivity of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* *bv. tryptophandestrans* and *A. baumannii*

Группы штаммов <i>A. baumannii</i> Groups of <i>A. baumannii</i> strains	Распределение штаммов по значениям МПК, мг/л тигециклина (n; %) Distribution of strains by MSC magnitude, tigecycline mg/l (n; %)				МПК, мг/л MSC, mg/l	
	0,5	1	2	4	50%	90%
<i>A. baumannii</i> <i>bv. tryptophandestrans</i> (n = 34)	18; 52,9	8; 23,6	3; 8,8	5; 14,7	0,5	4
<i>A. baumannii</i> (n = 52)	8; 15,4	9; 17,3	3; 25,0	22; 42,3	2	4

Список литературы/References

1. Клинические рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2021-01. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. [Clinical guidelines. Susceptibility testing to antimicrobial agents.v. 2021-01. Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy (IACMAC). (In Russ.)] URL: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf>
2. Патент № 2787267 Российская Федерация. МПК G01N 33/48(2006.01), C12Q1/04(2006.01), СПК G01 33/48(2022.08), C12Q1/04(2022.08), C12Q1/045(2022.08), C12Q2304/00(2022.08). Способ идентификации биовара бактерий *Acinetobacter baumannii* bv. tryptophandestrans; № 2022109368, заявлено 2022.04.07, опубликовано 2023.01.09 / Сиволодский Е.П. Патентообладатель Сиволодский Евгений Петрович. 7 с. [Patent No 2787267 Russian Federation, Int.Cl. G01 33/48(2006.01), C12Q1/04(2006.01), SP.CL.G01N 33/48(2022.08), C12Q1/04(2022.08), C12Q1/045(2022.08), C12Q 2304/00(2022.08). Method of identification of biovar bacteria *Acinetobacter baumannii* bv. tryptophandestrans; No 2022109368, application 2022.04.07; date of publication 2023.01.09 / Sivolodskij T.P. Proprietors. Sivolodskij Evgenij Petrovich. 7 p. (In Russ.)].
3. Сиволодский Е.П., Краева Л.А., Старкова Д.А., Михайлоов Н.В., Горелова Г.А. *Acinetobacter baumannii* bv. tryptophandestrans sp. nov., выделенный из клинического материала // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 5. С. 965–972. [Sivolodskii E.P., Kraeva L.A., Starkova D.A., Mikhailov N.V., Gorelova G.V. *Acinetobacter baumannii* bv. tryptophandestrans sp. nov., isolated from clinical samples. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 5, pp. 965–972. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ABB-1676

Авторы:

Сиволодский Е.П., д.м.н., профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия; старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических технологий ФБун НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Краева Л.А., д.м.н., зав. лабораторией медицинской бактериологии ФБун НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия;

Мельникова Е.В., врач-бактериолог лаборатории бактериологии Центральной клинико-диагностической лаборатории ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Горелова Г.В., зав. лабораторией бактериологии Центральной клинико-диагностической лаборатории ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Sivolodskii E.P., DSc (Medicine), Professor of the Department of Microbiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Biological Technologies, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Kraeva L.A., DSc (Medicine), Head of the Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute; Professor of the Department of Microbiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation;

Melnikova E.V., Bacteriologist, Laboratory of Bacteriology of the Central Clinical Diagnostic Laboratory, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation;

Gorelova G.V., Head of the Laboratory of Bacteriology, Central Clinical Diagnostic Laboratory, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation.

ИНДУКЦИЯ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА ДРОЖЖЕВЫМ КОМПОНЕНТОМ МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА КАК ФАКТОР ПАТОГЕННОСТИ МИКРОМИЦЕТОВ

В.В. Прокопьев^{1,2}, Н.В. Куклина¹, О.Н. Мазко¹, О.Г. Макарова¹

¹ ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Барнаул, Россия

² ООО Клинико-диагностическая лаборатория «Здоровье», г. Барнаул, Россия

Резюме. Введение в рутинную микробиологическую диагностику MALDI-ToF масс-спектрометрии привело к существенному расширению списка идентифицированных микроорганизмов. Данное явление затронуло и микологические исследования. В различных типах патологического материала стали выявляться редкие базидиомицеты и аскомицеты. Зачастую сложно оценить роль выделенных микромицетов в патогенезе того или иного заболевания. Кроме общепризнанных факторов патогенности, таких как ферменты агрессии, адгезивная активность и токсинообразование, существенную роль в патогенезе инфекционных заболеваний могут играть индукция или ингибирование активных форм кислорода. В нашем исследовании мы оценили общую прооксидантную и общую антиоксидантную активность культивируемых аскомицетных и базидиомицетных дрожжей микобиома кишечника человека. Штаммы микромицетов, исследованные в данной работе, были получены при культуральном исследовании кала пациентов с патологией желудочно-кишечного тракта и от здоровых людей, проходящих плановый медицинский осмотр. Идентификация проведена на основании морфологических, культуральных, биохимических свойств и подтверждена при помощи масс-спектрометрии. Суммарная прооксидантная и антиоксидантная активность оценивалась по индукции или ингибированию образования малонового диальдегида при окислении Твин-80. Было установлено, что уровень общей прооксидантной активности у *Rhodotorula mucilaginosa*, *Geotrichum candidum*, *Candida albicans*, *Pichia kudriavzevii* статистически достоверно превышает уровень общей антиоксидантной активности, причем прооксидантная активность *Pichia kudriavzevii* была более чем в 2 раза выше, чем у других исследованных микромицетов. Выявленная способность некоторых грибов индуцировать оксидантный стресс можно рассматривать как один из значимых факторов патогенности микроорганизмов, вызывающих патоморфологические изменения тканей кишечника человека.

Ключевые слова: оксидативный стресс, аскомицетные дрожжи, базидиомицетные дрожжи, прооксидантная активность, антиоксидантная активность, микобиота кишечника.

Адрес для переписки:

Прокопьев Василий Валерьевич
656038, Россия, г. Барнаул, пр. Ленина, 40,
Алтайский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (913) 262-42-47.
E-mail: prokopievvv@mail.ru

Contacts:

Vasilii V. Prokopiev
656038, Russian Federation, Barnaul, Lenin pr., 40,
Altai State Medical University.
Phone: +7 (913) 262-42-47.
E-mail: prokopievvv@mail.ru

Для цитирования:

Прокопьев В.В., Куклина Н.В., Мазко О.Н., Макарова О.Г. Индукция оксидативного стресса дрожжевым компонентом микробиоты человека как фактор патогенности микромицетов // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 175–180. doi: 10.15789/2220-7619-OSI-9636

Citation:

Prokopiev V.V., Kuklina N.V., Mazko O.N., Makarova O.G. Oxidative stress induced by the human microbiota yeast component as a micromycetes pathogenicity factor // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 175–180. doi: 10.15789/2220-7619-OSI-9636

OXIDATIVE STRESS INDUCED BY THE HUMAN MICROBIOTA YEAST COMPONENT AS A MICROMYCETES PATHOGENICITY FACTOR

Prokopyev V.V.^{a,b}, Kuklina N.V.^a, Mazko O.N.^a, Makarova O.G.^a

^a Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation

^b Clinical Diagnostic Laboratory "Zdorovie", Barnaul, Russian Federation

Abstract. The introduction of MALDI-ToF mass spectrometry into routine microbiological diagnostics has led to a widely extended list of identified microorganisms. This phenomenon also affected mycological studies. Rare basidiomycetes and ascomycetes began to be detected in various types of pathological material. It is often difficult to assess a role of isolated micromycetes in the pathogenesis of a certain disease. In addition to generally admitted pathogenicity factors, such as aggression enzymes, adhesive activity, and toxin formation, induction or inhibition of reactive oxygen species can play a prominent role in pathogenesis of infectious diseases. In our study, we evaluated the total prooxidant and total antioxidant activity of cultivated ascomycete and basidiomycete yeasts from the human intestinal mycobiome. The strains of micromycetes assessed here were obtained from a fecal culture study from patients with gastrointestinal tract pathology and healthy people undergoing a routine medical examination. Identification was carried out analyzing morphological, cultural, biochemical properties and confirmed by mass spectrometry. The total prooxidant and antioxidant activity was assessed by the induced or inhibited malondialdehyde formation during Tween-80 oxidation. It was found that the level of total prooxidant activity in *Rhodotorula mucilaginosa*, *Geotrichum candidum*, *Candida albicans*, *Pichia kudriavzevii* significantly exceeds the level of total antioxidant activity, and the *Pichia kudriavzevii* prooxidase activity was more than twice as high as in other studied micromycetes. The revealed ability of some fungi to induce oxidase stress can be considered as one of significant pathogenicity factors of microorganisms that cause pathomorphological changes in human intestinal tissues.

Key words: oxidative stress, yeast, pro-oxidant activity, antioxidant activity, intestinal mycobiota.

Введение

Увеличение доступности секвенирования нового поколения (NGS) и масс-спектрометрии привело к кратному росту количества работ, посвященных изучению бактериального компонента микробиома кишечника. Однако отмечается и рост количества работ, связанных с изучением грибов — микробиома кишечника.

Методы метагеномики и масс-спектрометрической идентификации культивируемых микроорганизмов кишечника расширили наши знания об этиологическом разнообразии бактерий и микромицетов желудочно-кишечного тракта.

Кроме хорошо изученных грибов рода *Candida* и *Aspergillus* появилась возможность идентификации микромицетов других таксономических групп.

Расширение спектра идентифицированных микромицетов привело к вопросу об их роли в симбиотических отношениях с организмом человека.

Обнаружение в патологическом материале недостаточно изученных микроорганизмов приводит к вопросу о роли найденного микромицета в данном конкретном заболевании. Часто в литературе наряду с сообщениями о патогенной роли того или иного микромицета встречаются сообщения и о его пробиотической активности [11, 13, 20]. Кроме того, микромицеты кишечника влияют на работу различных органов и систем [26], тем самым еще более затрудняя определение их роли во взаимоотношении с организмом человеком.

Для решение этого вопроса в первую очередь необходимо оценить патогенетический потенциал микроорганизма, который складывается из совокупности свойств, приводящих к способности повреждать органы и ткани организма хозяина. Традиционно эти свойства включают способность к адгезии, синтезу ферментов агрессии, токсинообразованию и т.д.

Помимо общепризнанных факторов патогенности есть ряд биологических процессов, которым уделяется недостаточно внимания. В настоящее время роль свободно-радикальных процессов в патогенезе соматических заболеваний человека и в качестве регуляторных физиологических механизмов не вызывает сомнений. С другой стороны, значение свободно-радикального окисления и перекисного окисления липидов (ПОЛ) во взаимоотношениях между отдельными представителями микробиоты и организмом человека изучены недостаточно. Работы, касающиеся данного вопроса, в большей степени посвящены антиоксидантной активности пробиотиков [8, 24]. Роль же прооксидантной активности кишечной микрофлоры изучена недостаточно.

Методы оценки про- и антиоксидантной активности различаются по типу источника окисления, окисляемого вещества и способа детекции окисленного соединения. Одним из наиболее принятых способов оценки ПОЛ является определение малонового диальдегида — основного биохимического маркера перекисного окисления биополимеров [23].

В нашей работе мы сравнили общую прооксидантную активность (ОПА) и общую анти-

оксидантную активность (ОАА) аскомицетных (*Candida albicans*, *Pichia* spp., *Geotrichum candidum*, *Wickerhamiella pararugosa*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Coniochaeta hoffmannii*) и базидиомицетных (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon asahii*) дрожжей, выделенных из кишечника человека.

Материалы и методы

В работе были исследованы базидомицетные дрожжи *Rhodotorula mucilaginosa* (20 штаммов), *Trichosporon asahii* (3 штамма) и аскомицетные дрожжи *Candida albicans* (11 штаммов), *Geotrichum candidum* (18 штаммов), *Pichia kudriavzevii* (7 штаммов), *Brettanomyces bruxellensis* (2 штамма), *Pichia kluyveri* (1 штамм), *Pichia fermentas* (1 штамм), *Pichia cactophila* (1 штамм) и *Wickerhamiella pararugosa* (1 штамм), *Coniochaeta hoffmannii* (1 штамм). Все штаммы были получены при бактериологическом исследовании кала пациентов амбулаторного отделения крупного медицинского центра.

Кал засеивался на среду Сабуро с 2% глюкозы и хлорамфениколом (0,4 г/л) и инкубировался при 35°C в течение 72 ч, далее чашки в течении недели инкубировались при температуре 25°C.

Идентификация дрожжей проводилась на основе их морфологических, биохимических и культуральных свойств при помощи Atlas of Clinical Fungi (De Hoog G.S. et al., 2020, 4th ed.) и Интернет-ресурса www.clinicalfungi.org.

Для более точной идентификации дрожжей был использован масс-спектрометр «Microflex» (Bruker Daltonik GmbH & Co. KG, Германия) с программным обеспечением MALDI Biotyper, использующий референсную базу данных (содержит более 2500 видов МО и 7800 штаммов).

Для оценки прооксидантной и антиоксидантной активности готовили суспензии 48–72-часовой культуры исследуемых микромицетов в физиологическом растворе хлорида натрия. При помощи Densi-La-Meter II (Erba Group, EU) суспензии доводили до оптической плотности, равной 1,0–2,5 МакФарланда, в зависимости от вида микроорганизма, что соответствовало 10⁷ КОЕ/мл (рассчитано при помощи камеры Горяева).

Суммарную прооксидантную активность оценивали по интенсивности окраски флуоресцентного комплекса, образующегося при взаимодействии продуктов перекисного окисления Твин-80 с тиобарбитуровой кислотой при помощи спектрофотометра « Cary 50 » (Varian, США) (результаты представлены в процентах от значения контрольной пробы [1]).

Антиоксидантную активность суспензий микромицетов оценивали по изменению интегрального показателя общей антиоксидантной активности [3] (определяется по ингибированию Fe²⁺/аскорбат индуцируемого накопления продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кисло-

той при окислении Твин-80 (результаты выражены в процентах от значения контрольной пробы).

Анализ и статистическая обработка данных был проведен при помощи расчета парного t-критерия Стьюдента. Анализ нормальности распределения проводился при помощи критерия Андерсона–Дарлинга, $p < 0,05$.

Результаты

Используемая в настоящей работе методика не позволяет оценить тонкие механизмы про- и антиоксидантной активности исследуемых микроорганизмов. В то же время оценка интегральных показателей ОАА и ОПА дают некоторое понимание об участии активных форм кислорода во взаимоотношении дрожжей кишечника с организмом человека.

На рис. представлены данные ОАА и ОПА исследуемых микромицетов.

К сожалению частота встречаемости некоторых грибов кишечника не позволяет нам провести полноценный, статистически достоверный анализ ОАА и ОПА, и полученные нами данные носят лишь ориентировочный характер.

В то же время данные, полученные при исследовании *R. mucilaginosa*, *G. candidum*, *C. albicans*, *P. kudriavzevii*, показывают значимость индуцируемой прооксидантной активности.

Из представленных данных видно, что ОПА исследуемых микроорганизмов статистически достоверно превышает их ОАА. Таким образом, в патогенезе заболеваний, вызванных *R. mucilaginosa*, *G. candidum*, *C. albicans*, *P. kudriavzevii*, окислительный стресс может играть существенное значение.

Среди изученных микроорганизмов обращает на себя внимание *P. kudriavzevii*, ОПА которой более чем в 2 раза превышает прооксидантную активность других микроорганизмов.

Несмотря на невозможность достоверной оценки ОАА и ОПА, штаммы *W. pararugosa*, *P. fermentas*, *P. cactophila* показали признаки антиоксидантной активности, что требует более внимательного их рассмотрения с точки зрения их пробиотической активности.

Обсуждение

Существует большое количество работ, подтверждающих участие оксидативного стресса в воспалительных заболеваниях кишечника, таких как болезнь Крона [6], неспецифическом язвенном колите [15] и других патологических процессах кишечника. Кроме того, с оксидативным стрессом связывают метаболический синдром [4], неалкогольный жировой гепатоз [7] и пр.

Экспериментальные данные показывают, что в присутствии кишечной микрофлоры энтероци-

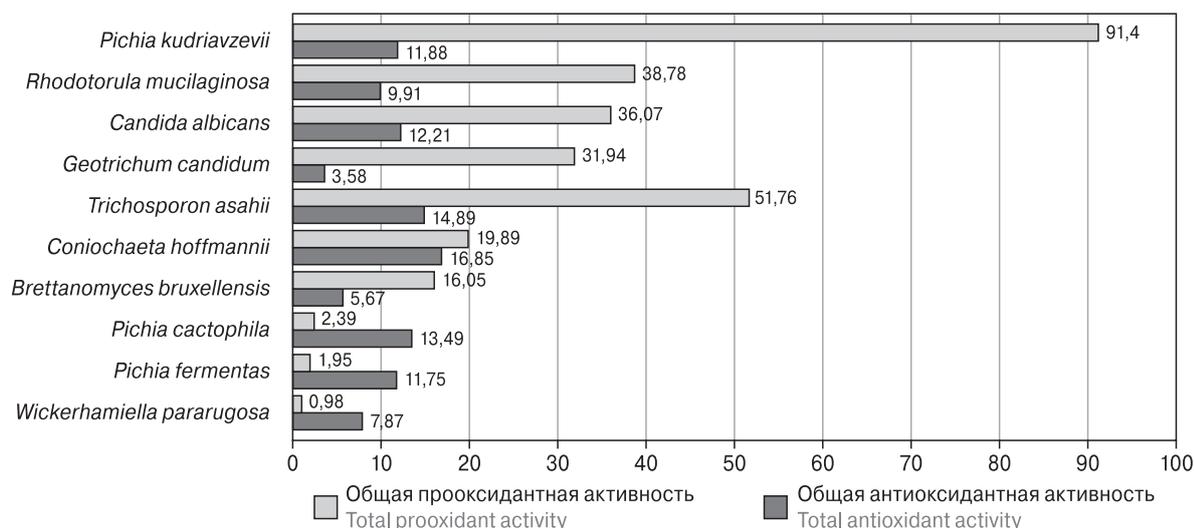


Рисунок. Общая прооксидантная и антиоксидантная активность дрожжей кишечника человека
Figure. Total prooxidant and antioxidant activity of human intestinal yeast

ты кишечника способны генерировать «физиологический уровень» оксидативного стресса [9]. Также была отмечена четкая связь между дисбиозом кишечника и окислительным стрессом [22, 25]. И в большинстве работ в качестве причины дисбиоза рассматривается окислительный стресс, независимо от причины, его вызвавшей.

В настоящей работе мы предлагаем рассмотреть точку зрения, согласно которой микроорганизмы, входящие в состав микрофлоры кишечника, способны вызывать накопление активных форм кислорода, что в свою очередь может запускать каскад патофизиологических изменений в тканях кишечника человека, приводящих к заболеванию.

В настоящем исследовании была выявлена статистически значимая прооксидантная активность грибов *R. mucilaginosa*, *G. candidum*, *C. albicans*, *P. kudriavzevii*.

Роль *C. albicans* в качестве этиологического агента заболеваний различных органов человека хорошо известна и не вызывает сомнений. Обнаруженная в настоящем исследовании прооксидантная активность *C. albicans* показывает наличие еще одного аспекта патогенеза кандидозов.

R. mucilaginosa описан как один из возбудителей фунгемии и поражения центральной нервной системы, хотя есть данные о поражении других биотопов [14]. В последние десятилетия отмечается значительный рост заболеваний, вызванных данным микромицетом. Центральная нервная система и кровь, чаще поражаемые этими грибами, относятся к органам с высоким парциальным давлением кислорода [16], что косвенно подтверждает важную роль прооксидантной активности, вызванной данным микромицетом в патологическом процессе.

G. candidum также стал чаще встречаться в качестве этиологического агента, поражающего эндокард, легкие, глаза и др. [10, 18, 21]. Его прооксидантная активность, по всей видимости, играет существенную роль в патогенезе вызываемых им заболеваний.

P. kudriavzevii, теломорф *Candida krusei*, способна вызывать фунгемии [19], перитонит [5] и другие патологии. С другой стороны, в ряде работ описаны пробиотические свойства данного микроорганизма [12, 17]. Обнаруженная в нашей работе его прооксидантная активность, вероятно, вносит существенный вклад в патогенность данных микроорганизмов.

Несмотря на недостаточный объем информации о значимости исследуемых микроорганизмов в патологии кишечника, данные микроорганизмы с более высокой частотой обнаруживаются у людей с патологией желудочно-кишечного тракта [2], чем у здоровых людей.

Образование малонового диальдегида также тесно связано с образованием простагландинов. Это соединение представляет собой альдегид и является одним из видов электрофильных соединений, которые вызывают токсический стресс в клетках и образуют ковалентные белковые аддукты (ALE), по аналогии с конечными продуктами гликирования. Таким образом, прооксидантная активность дрожжей кишечника может напрямую влиять на физиологические процессы тканей кишечника человека.

Результаты нашего исследования позволяют сделать предположение еще об одном механизме патогенного воздействия микромицетов на ткани организма человека. Для более достоверной оценки роли оксидативного стресса, индуцированного микромицетами кишечника, необходимы дальнейшее исследования.

Список литературы/References

1. Патент № 2146053 Российская Федерация, МПК G01N 33/53(2006.01), G01N 33/49(2006.01), G01N 33/84(2006.01). Способ определения прооксидантной активности биологического материала: № 97101937/14; заявлено 1997.02.10: опубликовано 2000.02.27 / Молчанов А.В., Галактионова Л.П. Патентообладатель: Алтайский государственный медицинский университет. 6 с. [Patent No. 2146053 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/53(2006.01), G01N 33/49(2006.01), G01N 33/84(2006.01). Method for determining pro-oxidation activity of a biological material. No. 97101937/14; application: 1997.02.10: date of publication 2000.02.27 / Molchanov A.V., Galaktionova L.P. Proprietor: Altajskij gosudarstvennyj meditsinskij universitet. 6 p.]
2. Прокопьев В.В., Куклина Н.В., Емельянова И.В., Звездкина Г.С. Анализ культивируемых грибов кишечника у пациентов с патологией желудочно-кишечного тракта и клинически здоровых людей // Проблемы медицинской микологии. 2023. Т. 25, № 1. С. 19–24. [Prokopiev V.V., Kuklina N.V., Emelyanova I.V., Zvezdkina G.S. Analysis of cultivated intestinal fungi in patients with pathology of the gastrointestinal tract and clinically healthy people. *Problemy meditsinskoj mikologii = Problems in Medical Mycology*, 2023, vol. 25, no. 1, pp. 19–25. (In Russ.)] doi: 10.24412/1999-6780-2023-1-19-24
3. Талалаева О.С., Зверев Я.Ф., Замятина С.В. Сравнительная оценка антиоксидантной и прооксидантной активностей препарата гистохром в экспериментах in vitro и in vivo // Бюллетень медицинской науки. 2017. № 4 (8). С. 30–35. [Talalaeva O.S., Zverev Ya.F., Zamyatina S.V. Comparative assessment of histochochrome's antioxidant and prooxidant activities in terms of in vitro and in vivo experiments. *Bulleten' meditsinskoj nauki = Bulletin of Medical Science*, 2017, no. 4 (8), pp. 30–35. (In Russ.)] doi: 10.31684/2541-8475.2017.4(8).30-35
4. Шантырь И.И., Родионов Г.Г., Фоминых Ю.А., Бацков С.С., Ушал И.Э., Колобова Е.А., Светкина Е.В., Санников М.В. Состояние микробиоты кишечника и параметры оксидативного стресса у пациентов с метаболическим синдромом // Экология человека. 2019. № 6. С. 23–29. [Shantyr' I.I., Rodionov G.G., Fominykh Yu.A., Batskov S.S., Ushal I.E., Kolobova E.A., Svetkina E.V., Sannikov M.V. Intestinal microbiota and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Ekologiya heloveka = Human Ecology*, 2019, no. 6, pp. 23–29. (In Russ.)] doi: 10.33396/1728-0869-2019-6-23-29
5. Al Bshabshe A., Joseph M.R.P., Battayah E.S., Hamid M.E. Fungal peritonitis caused by *Pichia kudriavzevii* following sleeve gastrectomy. *Ann. Saudi Med.*, 2019, vol. 39, no. 3, pp. 205–208. doi: 10.5144/0256-4947.2019.205
6. Alemany-Cosme E., Sáez-González E., Moret I., Mateos B., Iborra M., Nos P., Sandoval J., Beltrán B. Oxidative stress in the pathogenesis of Crohn's disease and the interconnection with immunological response, microbiota, external environmental factors, and epigenetics. *Antioxidants (Basel)*, 2021, vol. 10, no. 1: 64. doi: 10.3390/antiox10010064
7. Borrelli A., Bonelli P., Tuccillo F.M., Goldfine I.D., Evans J.L., Buonaguro F.M., Mancini A. Role of gut microbiota and oxidative stress in the progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocarcinoma: current and innovative therapeutic approaches. *Redox Biol.*, 2018, vol. 15, pp. 467–479. doi: 10.1016/j.redox.2018.01.009
8. Campanella D., Rizzello C.G., Fasciano C., Gambacorta G., Pinto D., Marzani B., Scarano N., De Angelis M., Gobbetti M. Exploitation of grape marc as functional substrate for lactic acid bacteria and bifidobacteria growth and enhanced antioxidant activity. *Food Microbiol.*, 2017, vol. 65, pp. 25–35. doi: 10.1016/j.fm.2017.01.019
9. Dumitrescu L., Popescu-Olaru I., Cozma L., Tulbă D., Hinescu M.E., Ceafalan L.C., Gherghiceanu M., Popescu B.O. Oxidative stress and the microbiota-gut-brain axis. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2018, vol. 2018: 2406594. doi: 10.1155/2018/2406594
10. Ghosh P., Boler A.K. *Geotrichum candidum*: a rare primary pathogen in pulmonary geotrichosis. *Indian J. Med. Res.*, 2020, vol. 152, suppl. 1, pp. S123–S124. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_2202_19
11. Hof H. *Rhodotorula* spp. in the gut – foe or friend? *GMS Infect. Dis.*, 2019, vol. 7: Doc02. doi: 10.3205/id000042
12. Hong S.M., Kwon H.J., Park S.J., Seong W.J., Kim I., Kim J.H. Genomic and probiotic characterization of SJP-SNU strain of *Pichia kudriavzevii*. *AMB Express*, 2018, vol. 8, no. 1: 80. doi: 10.1186/s13568-018-0609-0
13. Jagirdar J., Geller S.A., Bottone E.J. *Geotrichum candidum* as a tissue invasive human pathogen. *Hum. Pathol.*, 1981, vol. 12, no. 7, pp. 668–671. doi: 10.1016/s0046-8177(81)80055-x
14. Jarros I.C., Veiga F.F., Corrêa J.L., Barros I.L.E., Gadelha M.C., Voidaleski M.F., Pieralisi N., Pedroso R.B., Vicente V.A., Negri M., Svidzinski T.I.E. Microbiological and virulence aspects of *Rhodotorula mucilaginosa*. *EXCLI J.*, 2020, vol. 19, pp. 687–704.
15. Koch T.R., Yuan L.X., Stryker S.J., Ratliff P., Telford G.L., Opara E.C. Total antioxidant capacity of colon in patients with chronic ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.*, 2000, vol. 45, no. 9, pp. 1814–1819. doi: 10.1023/a:1005517824877
16. Meena S., Singh G., Dabas Y., Rajshekhar P., Xess I. *Geotrichum candidum* in infective endocarditis. *J. Glob. Infect. Dis.*, 2017, vol. 9, no. 3, pp. 127–128. doi: 10.4103/jgid.jgid_112_16
17. Moure M.C., Pérez Torrado R., Garmendia G., Vero S., Querol A., Alconada T., León Peláez Á. Characterization of kefir yeasts with antifungal capacity against *Aspergillus* species. *Int. Microbiol.*, 2023, vol. 26, no. 2, pp. 361–370. doi: 10.1007/s10123-022-00296-z
18. Myint T., Dykhuizen M.J., McDonald C.H., Ribes J.A. Post operative fungal endophthalmitis due to *Geotrichum candidum*. *Med. Mycol. Case Rep.*, 2015, vol. 10, pp. 4–6. doi: 10.1016/j.mmcr.2015.11.001
19. Nagarathamma T., Chunchanur S.K., Rudramurthy S.M., Vineetha K.R., Ramamurthy K., Joseph J., Ambica R. Outbreak of *Pichia kudriavzevii* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *J. Med. Microbiol.*, 2017, vol. 66, no. 12, pp. 1759–1764. doi: 10.1099/jmm.0.000645
20. Noor-Ul H., Haokun L., Junyan J., Xiaoming Z., Dong H., Yunxia Y., Shouqi X. Dietary supplementation of *Geotrichum candidum* improves growth, gut microbiota, immune-related gene expression and disease resistance in gibel carp CAS (Carassius auratus gibelio). *Fish Shellfish Immunol.*, 2020, vol. 99, pp. 144–153. doi: 10.1016/j.fsi.2020.02.001
21. Singhal R., Shah Y.M. Oxygen battle in the gut: Hypoxia and hypoxia-inducible factors in metabolic and inflammatory responses in the intestine. *J. Biol. Chem.*, 2020, vol. 295, no. 30, pp. 10493–10505. doi: 10.1074/jbc.REV120.011188
22. Tomasello G., Mazzola M., Leone A., Sinagra E., Zummo G., Farina F., Damiani P., Cappello F., Gerges Geagea A., Jurjus A., Bou Assi T., Messina M., Carini F. Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, 2016, vol. 160, no. 4, pp. 461–466. doi: 10.5507/bp.2016.052

23. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges. *Anal. Biochem.* 2017, vol. 524, pp. 13–30. doi: 10.1016/j.ab.2016.10.021
24. Wang Y., Wu Y., Wang Y., Xu H., Mei X., Yu D., Wang Y., Li W. Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 2017, vol. 9, no. 5: 521. doi: 10.3390/nu9050521
25. Weiss G.A., Hennot T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2017, vol. 74, no. 16, pp. 2959–2977. doi: 10.1007/s00018-017-2509-x
26. Wu X., Xia Y., He F., Zhu C., Ren W. Intestinal mycobiota in health and diseases: from a disrupted equilibrium to clinical opportunities. *Microbiome*, 2021, vol. 9, no. 1: 60. doi: 10.1186/s40168-021-01024-x

Авторы:

Прокопьев В.В., к.б.н., доцент кафедры эпидемиологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Барнаул, Россия; врач-бактериолог ООО КДЛ «Здоровье», г. Барнаул, Россия;
Куклина Н.В., к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Барнаул, Россия;
Мазко О.Н., к.б.н., доцент кафедры фармакологии им. профессора В.М. Брюханова ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Барнаул, Россия;
Макарова О.Г., к.б.н., доцент кафедры фармакологии им. профессора В.М. Брюханова ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Барнаул, Россия.

Authors:

Prokopyev V.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Epidemiology, Microbiology and Virology, Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation; Bacteriologist, Clinical Diagnostic Laboratory "Zdorovie", Barnaul, Russian Federation;
Kuklina N.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology, Microbiology and Virology, Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation;
Mazko O.N., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Pharmacology named after professor V.M. Bryukhanov, Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation;
Makarova O.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Pharmacology named after professor V.M. Bryukhanov, Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ COVID-19 НАСЕЛЕНИЯ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В ПЕРИОДЫ ПРЕОБЛАДАНИЯ ГЕНОВАРИАНТОВ DELTA И OMICRON

А.А. Зимирова¹, В.Е. Куклев¹, В.А. Сафронов¹, И.Н. Вяткин²

¹ ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия

² Управление Роспотребнадзора по Саратовской области, г. Саратов, Россия

Резюме. Несмотря на стабильное снижение уровня заболеваемости COVID-19, вызываемым вирусом SARS-CoV-2, в большинстве стран мира к концу 2023 г., проблема распространения данной инфекции в глобальном масштабе продолжает оставаться актуальной. Среди всех известных геновариантов SARS-CoV-2 доминирующим на протяжении почти двух лет остается Omicron. Отличительными свойствами данного геноварианта являются короткий инкубационный период (1–5 сут.), высокая контагиозность, относительно легкое течение заболевания, что связано с наибольшим среди всех геновариантов SARS-CoV-2 числом мутаций в геноме. Первый случай заражения геновариантом Omicron в России зафиксирован в начале декабря 2021 г. На протяжении многих месяцев наблюдения за активным распространением геноварианта в России является очевидным, что он существенно отличается от предыдущих геновариантов SARS-CoV-2 по ряду ключевых характеристик. Изучение основных закономерностей, присущих эпидемическому процессу новой коронавирусной инфекции, в частности выявление региональных особенностей, является одним из важнейших направлений эпиднадзора за COVID-19. В настоящей статье проведен сравнительный анализ структуры заболеваемости COVID-19 населения Саратовской области в периоды преобладания геновариантов Delta и Omicron. При анализе использована статистическая отчетность Управления Роспотребнадзора по Саратовской области. Основным методом исследования — эпидемиологический анализ. Результаты исследования показали, что в период доминирования геноварианта Omicron зафиксировано увеличение доли заболевших среди детей разного возраста, увеличение числа инфицированных с неустановленным источником инфекции и облегчение клинического течения болезни. Лица пожилого возраста вне зависимости от циркулирующего геноварианта продолжают оставаться в группе риска. Таким образом, спустя три года пандемии COVID-19 прослеживается взаимная адаптация нового коронавируса к человеческой популяции, что сопровождается изменением биологических свойств возбудителя и накоплением иммунной прослойки населения. Облегчение симптомов заболевания и снижение показателя летальности среди инфицированных геновариантом Omicron свидетельствует в пользу дальнейшего преобразования COVID-19 в сезонную инфекцию.

Ключевые слова: COVID-19, Delta, Omicron, заболеваемость, геноварианты, Саратовская область.

Адрес для переписки:

Зимирова Анастасия Александровна
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб» Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (917) 022-60-94 (моб.).
E-mail: zi_749@mail.ru

Contacts:

Anastasia A. Zimirova
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46,
Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадzor.
Phone: +7 (917) 022-60-94 (mobile).
E-mail: zi_749@mail.ru

Для цитирования:

Зимирова А.А., Куклев В.Е., Сафронов В.А., Вяткин И.Н. Сравнительный анализ структуры заболеваемости COVID-19 населения Саратовской области в периоды преобладания геновариантов Delta и Omicron // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 181–186. doi: 10.15789/2220-7619-CAP-17555

Citation:

Zimirova A.A., Kuklev V.E., Safronov V.A., Vyatkin I.N. Comparatively analyzed pattern of Delta and Omicron SARS-CoV-2 genovariant dominated COVID-19 incidence in the population of the Saratov Region // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 181–186. doi: 10.15789/2220-7619-CAP-17555

COMPARATIVELY ANALYZED PATTERN OF DELTA ANDOMICRON SARS-CoV-2 GENOVARIANT DOMINATED COVID-19 INCIDENCE IN THE POPULATION OF THE SARATOV REGION

Zimirova A.A.^a, Kuklev V.E.^a, Safronov V.A.^a, Vyatkin I.N.^b

^a Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation

^b Department of Rospotrebnadzor for the Saratov Region, Saratov, Russian Federation

Abstract. Despite the stable decline in SARS-CoV-2 virus-caused COVID-19 incidence in most countries worldwide by the end of 2023, spreading of this infection on a global scale remains relevant. Among all known SARS-CoV-2 genovariants, within the last about two years Omicron remains dominant. The distinctive properties of this genovariant are presented by short incubation period (1–5 days), high contagiousness, and a relatively mild disease course due to largest number of genomic mutations among all SARS-CoV-2 genovariants. The first case of Omicron genovariant-caused infection in Russia was recorded in early December 2021. Over many month-monitoring after active spread of the genovariant in Russia, it is obvious that in a number of key characteristics it differs profoundly from previous SARS-CoV-2 genovariants. Analyzing major patterns inherent in COVID-19 epidemic process particularly uncovering geographic features is one of the most crucial activities in COVID-19 surveillance. Here, we provide a comparatively analyzed pattern of Delta and Omicron SARS-CoV-2 genovariant dominated COVID-19 incidence in the population of the Saratov region. For this, there was used statistical reporting from the Office of Rospotrebnadzor for the Saratov Region. The main research method is based on epidemiological analysis. The study data showed that upon Omicron genovariant dominance, an increased percentage in COVID-19 cases among children of varying age, increased rate of infected subjects with unknown source of infection as well as improved clinical disease course were recorded. Regardless of the circulating genovariant, elderly people remain to be in risk group. Thus, after three years of the COVID-19 pandemic, the mutual adaptation for SARS-CoV-2 and human population can be observed, which is accompanied by altered biological properties of the former and the accumulation of herd immunity. Alleviated disease symptoms and decreased mortality rate among Omicron genovariant-infected individuals evidence in favor of further COVID-19 transformation into a seasonal infection.

Key words: COVID-19, Delta, Omicron, incidence, genovariants, Saratov Region.

Введение

Впервые за несколько десятилетий мировая медицина столкнулась с глобальной угрозой здоровью человека в связи с появлением респираторной инфекции, вызванной новым коронавирусом (SARS-CoV-2), которой Всемирная организация здравоохранения 11 февраля 2020 г. присвоила официальное название — COVID-19.

Пандемия COVID-19 стала одним из самых серьезных вызовов для мирового сообщества [6]. Масштаб экстенсивных и интенсивных параметров распространения COVID-19 (более 200 охваченных пандемией стран и свыше 750 млн случаев заболевания, в том числе свыше 6,9 млн летальных исходов) многократно превзошел не только проявления инфекционных болезней, вызванных близкородственными коронавирусами тяжелого острого респираторного синдрома (SARS, ТОРС) и ближневосточного респираторного синдрома (MERS, БВРС) [4], но и известных пандемий, которые произошли ранее.

Ключевым звеном, определяющим основные особенности патогенеза, клиники и эпидемиологии SARS-CoV-2, является его мутагенез, приведший к естественному отбору нескольких мутаций с отчетливыми функциональными особенностями [14]. Интенсивное развитие эпидемического процесса COVID-19 создало благоприятные эволюционные условия для появления генетических вариантов возбудителя,

которые отличаются высокой контагиозностью, таких как Delta (B.1.617.2) и Omicron [9].

Многочисленные научные исследования показали, что среди пациентов, инфицированных геновариантом Delta, в отличие от Omicron, зафиксирована более высокая доля госпитализированных в отделения интенсивной терапии, а также доля умерших из-за преимущественно тяжелого течения болезни и возникающих осложнений [1, 8, 13], в то время как геновариант Omicron, содержащий наибольшее количество мутаций в спайк-белке SARS-CoV-2, по сравнению с другими существующими геновариантами, вызывает более легкое течение болезни, чем Delta [10, 12].

Геновариант Delta после первого обнаружения в Индии в 2020 г. начал активно распространяться по странам мира, в том числе и в Российской Федерации. По данным открытого российского консорциума по секвенированию геномов SARS-CoV-2, Delta составлял более половины (52%) во всех образцах, полученных в мае 2021 г., и более 90% — в июне [2]. Первый случай инфицирования геновариантом Omicron в России зафиксирован в начале декабря 2021 г. В дальнейшем указанный геновариант активно распространился во всех субъектах страны, став доминирующим в структуре заболеваемости с начала 2022 г. (51,6%) и по настоящее время (100%).

Изучение основных закономерностей, присущих эпидемическому процессу новой коронавирусной инфекции в России, а также вы-

явление региональных особенностей, является одним из важнейших направлений эпиднадзора за COVID-19. С учетом вышеперечисленного, представляется актуальным проанализировать структуру заболеваемости COVID-19 в периоды преобладания двух наиболее значимых геновариантов SARS-CoV-2 (Delta и Omicron) на примере отдельного субъекта страны — Саратовской области.

Цель работы — сравнительный анализ структуры заболеваемости COVID-19 населения Саратовской области в периоды преобладания геновариантов Delta и Omicron.

Материалы и методы

Материалом для настоящего исследования послужила статистическая отчетность Управления Роспотребнадзора по Саратовской области, включающая персонифицированные данные о каждом зарегистрированном случае заболевания COVID-19 за период с 12.08.2021 по 14.03.2022 гг. Основным методом исследования — эпидемиологический анализ. Информация о заболевших (возраст, пол, социальная группа, характер течения болезни и др.) получена из базы данных, сформированной на основе материалов формы статистического учета № 1035. Для проведения анализа в когорте заболевших выделены следующие возрастные группы: «дети до года», «1–6 лет», «7–14 лет», «15–17 лет», «18–29 лет», «30–49 лет», «50–64 лет» и «65 лет и старше». Временные диапазоны для анализа подобраны таким образом, чтобы в разных возрастных группах было сопоставимое число наблюдений. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием общепринятых методов вариационной статистики и пакета компьютерных программ Microsoft Word, Microsoft Excel. В исследовании также использовались данные региональных СМИ и Интернет-ресурса «Стопкоронавирус.рф».

Результаты и обсуждение

Всего с момента регистрации первого случая инфицирования COVID-19 и по состоянию на 22 октября 2023 г. в Саратовской области зарегистрировано 327 310 случаев заболевания (13 460 на 100 тыс. населения, 9 место по Приволжскому федеральному округу, 23 место среди всех субъектов РФ), из них 6001 случай заболевания закончился летальным исходом (коэффициент летальности 0,85) [3]. Максимальный подъем заболеваемости COVID-19 с показателем 3313 случаев отмечен 20 февраля 2022 г. На долю Саратовской области приходится 1,41% от всех зарегистрированных случаев заболевания COVID-19 в России.

Геновариант Omicron впервые выделен в Саратовской области 19 января 2022 г. (2 случая заболевания — мужчина в возрасте 47 лет и женщина в возрасте 65 лет). Оба заболевших перенесли инфекцию в форме ОРВИ, не были вакцинированы от COVID-19 и не выезжали за пределы субъекта в предыдущие 2 недели. К середине февраля 2022 г. Omicron стал преобладающим геновариантом SARS-CoV-2 в регионе (83% положительных образцов), вытеснив с первой позиции геновариант Delta.

Сравнительный анализ структуры заболеваемости COVID-19 в периоды доминирования геновариантов Delta (12.08 — 21.09.2021 г.) и Omicron (07.03 — 14.03.2022 г.) среди населения Саратовской области позволил выявить ряд особенностей.

За анализируемые периоды доминирования двух геновариантов установлено преобладание женщин в структуре заболеваемости (61,3% случаев в период Delta и 62,7% случаев в период Omicron). Согласно данным Росстата, по состоянию на 1 января 2022 г. в регионе числится 1085,2 тыс. мужчин (45,9%) и 1275,8 тыс. женщин (54,1%), что косвенно может объяснять более высокие показатели заболеваемости среди женского пола. Кроме того, полученные данные, вероятно, могут быть связаны с более частой обращаемостью женщин за медицинской помощью, что обуславливает более высокое число подтвержденных случаев заболевания среди них.

Существенные отличия выявлены в социальной структуре инфицированных Саратовской области. В частности, значительное увеличение частоты регистрации случаев заболевания, вызванных геновариантом Omicron, установлено в категории воспитанников/учащихся (с 8 до 29%). Снижение доли случаев заболевания зафиксировано среди представителей рабочих профессий (с 44,4 до 30,1%) и среди работников медицинских организаций (с 8,9 до 6%). Доля случаев заболевания среди пенсионеров в периоды доминирования Delta и Omicron не претерпела существенных изменений (32,7 и 32,4% соответственно) (рис. 1).

В возрастной структуре инфицированных COVID-19 в период доминирования геноварианта Omicron увеличение доли заболевших наблюдается среди детей первого года жизни (с 0,6 до 1,5%), детей в возрасте 1–6 лет (с 3,6 до 7,2%), 7 — 14 лет (с 4,4 до 10,8%) и 15–17 лет (с 1,8 до 3,7%). Снижение доли инфицированных зафиксировано среди лиц в возрасте 30–49 лет (с 32,7 до 24,4%), 50–64 года (с 25,1 до 21,4%) и незначительное снижение — среди лиц 65 лет и старше (с 20,9 до 20,2%). Установленное увеличение частоты регистрации случаев заболевания геновариантом Omicron среди воспитанников/учащихся, а также рост доли заболевших среди детей и подрост-

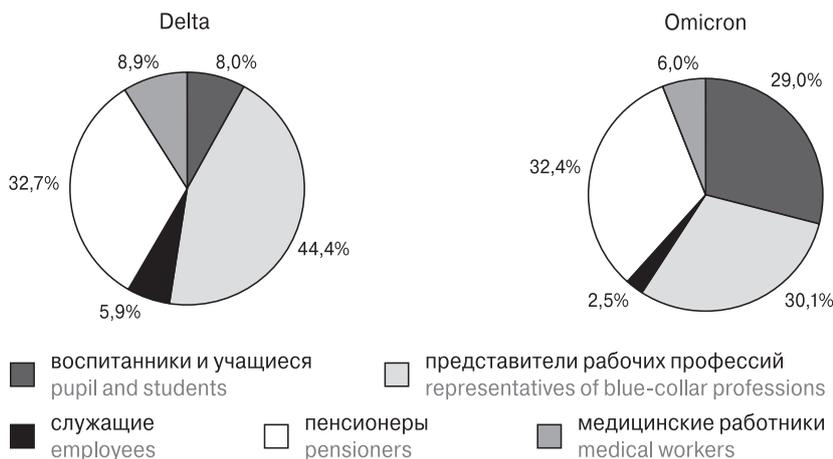


Рисунок 1. Доли случаев заболевания геновариантами Delta и Omicron среди населения Саратовской области в различных социальных группах

Figure 1. Percentage of SARS-CoV-2 Delta and Omicron genovariant-based COVID-19 cases in various social groups of the Saratov Region

ков до 18 лет свидетельствует о продолжающейся адаптации вируса к человеческой популяции. Геновариант Omicron, в отличие от Delta, значительно активнее реплицируется в месте своего проникновения в организм — назальном эпителии, носоглотке и бронхах, что подтверждается рядом исследований [5, 7]. У детей раннего возраста строение бронхов имеет отличия от взрослых: анатомически узкий просвет, активная васкуляризация и более рыхлая слизистая оболочка. Благодаря данным особенностям у детей чаще развиваются такие состояния, как обструктивный бронхит и бронхиолит, требующие неотложной помощи. Возрастные особенности развития организма в сочетании со множественными мутациями самого вируса, по-видимому, являются основными причинами роста заболеваемости геновариантом Omicron у детей.

В отношении источников инфицирования в период преобладания геноварианта Delta основная часть случаев заражения зафиксиро-

вана вследствие контактов в семье/близком окружении (52,6%), затем следуют случаи с неустановленным источником инфекции (33,1%), по месту работы/в прочих организациях (9,5%) и в медицинских организациях (4,8%). При этом в период доминирования геноварианта Omicron наблюдается увеличение доли заболевших без установления источника инфекции (40,2%) и снижение регистрации случаев в семье/близком окружении (48,7%), по месту работы/в прочих организациях (7,4%) и в медицинских организациях (3,7%). Данное наблюдение может свидетельствовать о значительном количестве бессимптомных носителей среди заболевших в связи с особенностями геноварианта Omicron, который, как показано в ряде научных исследований, вызывает до 61% случаев асимптоматического течения болезни [11].

Инфекция, вызванная геновариантом Omicron, среди населения Саратовской области протекала чаще всего в легкой форме, удельный вес

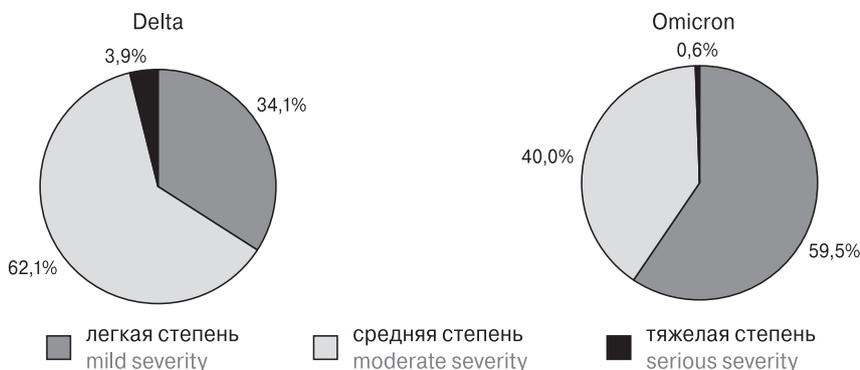


Рисунок 2. Структура инфицированных по степени тяжести заболевания в периоды доминирования геновариантов Delta и Omicron в Саратовской области

Figure 2. Pattern of COVID-19 severity-based incidence dominated by SARS-CoV-2 Delta and Omicron genovariants in the Saratov Region

вырос с 34,1 до 59,5%, в основном за счет сокращения доли случаев заболевания средней тяжести с 62,1 до 40%. Геновариант Delta вызвал более высокую долю случаев заболевания с тяжелым течением в сравнении с Omicron (3,9% против 0,6%). Наблюдаемое явление может быть обусловлено как эволюцией вируса, которая сопровождается снижением вирулентности, так и повышением доли полностью вакцинированного населения (с 25,5% в период Delta до 46,3% в период Omicron) (рис. 2).

Уровень летальности среди инфицированных региона в периоды доминирования двух геновариантов, а также доля вирусных пневмоний подтверждают, что при Delta-инфекции тяжесть течения болезни выше в сравнении с Omicron-инфекцией. Сравнительный анализ также показал, что наиболее уязвимыми группами населения Саратовской области вне зависимости от циркулирующего геноварианта являются лица 65 лет и старше. Люди пожилого возраста с большей вероятностью попадают в отделения реанимации и интенсивной терапии с высоким риском летального исхода, поэтому пациентам старше 65 лет должно уделяться наибольшее внимание клиницистов (рис. 3, 4).

Выводы

За 3 года пандемии COVID-19 имела место взаимная адаптация нового коронавируса и человеческой популяции, что сопровождалось изменением биологических свойств возбудителя и накоплением иммунной прослойки населения.

Преимущественно легкое течение заболевания и снижение показателя летальности среди инфицированных геновариантом Omicron сви-

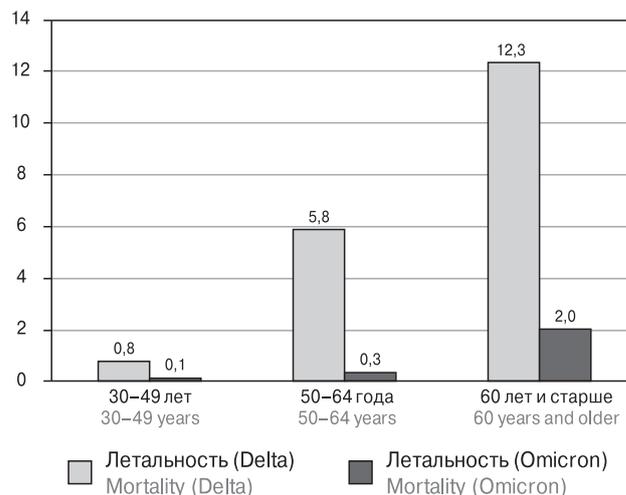


Рисунок 3. Уровни летальности в периоды доминирования геновариантов Delta и Omicron среди заболевших Саратовской области (в %)

Figure 3. COVID-19 mortality rate in the Saratov Region dominated by SARS-CoV-2 Delta and Omicron genovariants (in %)

детельствует в пользу дальнейшего преобразования COVID-19 в сезонную инфекцию.

Учитывая повышение уровня заболеваемости среди детей, особое внимание при диагностике и лечении инфекции должно быть направлено на младенцев (до 1 года), а также детей с хроническими заболеваниями и иммунодефицитными состояниями.

Поскольку эволюция вируса все еще продолжается, профилактические меры, в том числе ревакцинация для групп риска, в особенности лиц старше 65 лет, остаются по-прежнему актуальными.

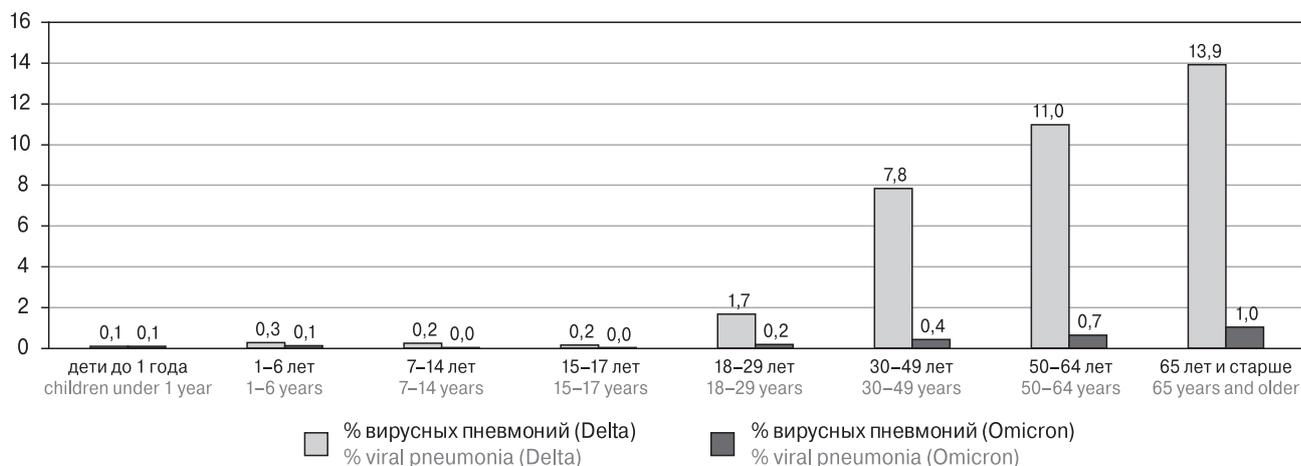


Рисунок 4. Доля вирусных пневмоний в периоды доминирования геновариантов Delta и Omicron среди заболевших Саратовской области (в %)

Figure 4. Percentage of viral pneumonia upon dominance of SARS-CoV-2 Delta and Omicron genovariants in the Saratov Region (in %)

Список литературы/References

1. Горелов А.В., Плоскирева А.А., Музыка А.Д. Эволюция клинико-патогенетических особенностей коронавирусной инфекции COVID-19 // ПМЖ. Медицинское обозрение. 2022. Т. 6, № 11. С. 626–634. [Gorelov A.V., Ploskireva A.A., Muzyka A.D. Evolution of clinical and pathogenetic features of coronavirus infection COVID-19. *RMZh. Meditsinskoe obozrenie = Russian Medical Inquiry*, 2022, vol. 6, no. 11, pp. 626–634. (In Russ.)] doi: 10.32364/2587-6821-2022-6-11-626-634
2. Индийский штамм нашли в 90% исследованных российских образцов коронавируса // Известия. [The Indian strain was found in 90% of the Russian coronavirus samples studied. *Izvestia*. (In Russ.)] 16.06.2021. URL: <https://iz.ru/1179239/2021-06-16/indiiskii-shtamm-nashli-v-90-issledovannykh-rossiiskikh-obraztcov-koronavirusa> (21.11.2023)
3. Объясняем.рф. [Explain.rf (In Russ.)]. URL: <https://xn--90aivcdt6dxc.xn--plai/stopkoronavirus> (20.11.2023)
4. Удовиченко С.К., Никитин Д.Н., Жуков К.В., Топорков А.В., Викторов Д.В., Зубарева О.В., Климина И.А., Таратутина М.Н. Эпидемические проявления COVID-19 в Волгоградской области в период 2020–2021 гг. // Вестник ВолГМУ. 2021. № 4 (80). [Udovichenko S.K., Nikitin D.N., Zhukov K.V., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Zubareva O.V., Klimina I.A., Taratutina M.N. Epidemic manifestations of COVID-19 in the Volgograd Region in the period 2020–2021. *Vestnik VolGМУ = Bulletin of Volgograd State Medical University*, 2021, no. 4 (80). (In Russ.)] URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/epidemicheskie-proyavleniya-covid-19-v-volgogradskoy-oblasti-v-period-2020-2021-gg> (18.11.2023)
5. Diamond M., Halfmann P., Maemura T., Iwatsuki-Horimoto K., Iida S., Kiso M., Scheaffer S., Darling T., Joshi A., Loeber S., Foster S., Ying B., Whitener B., Floyd K., Ujie M., Nakajima N., Ito M., Wright R., Uraki R., Li R., Sakai Y., Liu Y., Larson D., Osorio J., Hernandez-Ortiz J., Ciuoderis K., Florek K., Patel M., Bateman A., Odle A., Wong L.Y., Wang Z., Edara V.V., Chong Z., Thackray L., Ueki H., Yamayoshi S., Imai M., Perlman S., Webby R., Seder R., Suthar M., Garcia-Sastre A., Schotsaert M., Suzuki T., Boon A., Kawaoka Y., Douek D., Moliva J., Sullivan N., Gagne M., Ransier A., Case J., Jeevan T., Franks J., Fabrizio T., DeBeauchamp J., Kercher L., Seiler P., Singh G., Warang P., Gonzalez-Reiche A.S., Sordillo E., van Bakel H., Simon V. The SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus causes attenuated infection and disease in mice and hamsters. *Res. Sq.* [Preprint]. 2021. rs.3.rs-1211792. doi: 10.21203/rs.3.rs-1211792/v1
6. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Communicable disease threats report. 2021. Week 35, 29 August–4 September. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Communicable-disease-threats-report4-september-2021.pdf> (14.11.2023)
7. Guo Y.R., Cao Q.D., Hong Z.S., Tan Y.Y., Chen S.D., Jin H.J., Tan K.S., Wang D.Y., Yan Y. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak — an update on the status. *Mil. Med. Res.*, 2020, vol. 7, no. 1: 11. doi: 10.1186/s40779-020-00240-0.
8. Lin L., Liu Y., Tang X., He D. The disease severity and clinical outcomes of the SARS-CoV-2 variants of concern. *Front. Public Health*, 2021, vol. 9: 775224. doi: 10.3389/fpubh.2021.775224
9. Pearson C., Silal S., Li M.W.Z., Dushoff J., Bolker B., Abbott S., van Schalkwyk C., Davies N., Barnard R., Edmunds J., Bingham J., Meyer-Rath G., Jamieson L., Glass A., Wolter N., Govender N., Stevens W., Scott L., Mlisana K., Moultrie H., Pulliam J. Bounding the levels of transmissibility & immune evasion of the Omicron variant in South Africa. *MedRxiv*. 2021. doi: 10.1101/2021.12.19.21268038
10. Saxena S.K., Kumar S., Ansari S., Paweska J.T., Maurya V.K., Tripathi A.K., Abdel-Moneim A.S. Characterization of the novel SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant of concern and its global perspective. *J. Med. Virol.*, 2022, vol. 94, no. 4, pp. 1738–1744. doi: 10.1002/jmv.27524
11. Shang W., Kang L., Cao G., Wang Y., Gao P., Liu J., Liu M. Percentage of asymptomatic Infections among SARS-CoV-2 Omicron variant-positive individuals: a systematic review and meta-analysis. *Vaccines (Basel)*, 2022, vol. 10, no. 7: 1049. doi: 10.3390/vaccines10071049
12. Singhal T. The emergence of Omicron: challenging times are here again! *Indian J. Pediatr.*, 2022, vol. 89, no. 5, pp. 490–496. doi: 10.1007/s12098-022-04077-4
13. Tian D., Sun Y., Zhou J., Ye Q. The global epidemic of the SARS-CoV-2 Delta variant, key spike mutations and immune escape. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 751778. doi: 10.3389/fimmu.2021.751778
14. Yang W., Yang S., Wang L., Zhou Y., Xin Y., Li H., Mu W., Wu Q., Xu L., Zhao M., Wang C., Yu K. Clinical characteristics of 310 SARS-CoV-2 Omicron variant patients and comparison with Delta and Beta variant patients in China. *Virol. Sin.*, 2022, vol. 37, no. 5, pp. 704–715. doi: 10.1016/j.virs.2022.07.014

Авторы:

Зимирова А.А., младший научный сотрудник лаборатории санитарной охраны и ЧС отдела эпидемиологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Куклев В.Е., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории санитарной охраны и ЧС отдела эпидемиологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Сафронов В.А., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории эпидемиологического анализа и прогнозирования отдела эпидемиологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Вяткин И.Н., начальник отдела эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Управления Роспотребнадзора по Саратовской области, г. Саратов, Россия.

Authors:

Zimirova A.A., Junior Researcher, Laboratory of Sanitary Protection and Emergency Situations, Epidemiology Department, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation;
Kuklev V.E., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Sanitary Protection and Emergency Situations, Epidemiology Department, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation;
Safonov V.A., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Epidemiological Analysis and Forecasting, Epidemiology Department, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation;
Vyatkin I.N., Head of the Department of Epidemiological Surveillance and Sanitary Protection of the Territory, Rospotrebnadzor Office for the Saratov Region, Saratov, Russian Federation.

Поступила в редакцию 14.12.2023
 Принята к печати 26.02.2024

Received 14.12.2023
 Accepted 26.02.2024

PREVALENCE OF *SUTTERELLA WADSWORTHENSIS* IN THE FECAL MICROBIOTA OF OBESE CHILDREN

O.V. Skvortsova, K.A. Kaiumov, V.A. Ulivanova, D.V. Alekseev, A.V. Lyamin, N.B. Migacheva, D.D. Ismatullin

Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation

Abstract. *Sutterella wadsworthensis* are Gram-negative, non-spore-forming, bile-resistant, microaerophilic bacteria. IgA-specific serine endopeptidase is among one of the crucial biochemical traits of *S. wadsworthensis*. In scientific publications, *Sutterella* spp. has been linked to ulcerative colitis, autism spectrum disorder, and obesity in children. Moreover, after analyzing various clinical complications in obese patients, it was found that *Sutterella* spp. influences an increase in insulin resistance, which subsequently leads to the development of type 2 diabetes. Here, the fecal microbiome from 156 patients in the pediatric department was analyzed, of which 23 children comprised control group, 23 children — with obesity lacking concomitant pathology, 110 children — with obesity and concomitant pathology. The study was aimed at determining a correlation between microorganism *S. wadsworthensis* and types of obesity in children as well as its role in developing this pathology. As a result, a direct relationship was revealed between the isolated bacillus and obesity without concomitant pathology in girls vs boys aged 14 to 17 years, and data were also obtained that *S. wadsworthensis* was isolated significantly more often. In addition, it was decided to analyze microorganisms associated with *S. wadsworthensis* in order to identify microbiome members characteristic of obese people. Statistical processing revealed a marked significant positive correlation with the isolation of *Streptococcus* spp., *S. anginosus*, *C. perfringens*, *S. aureus* and *W. confusa*. In addition, the ability of *S. wadsworthensis* to reduce the functionality of the intestinal antibacterial immune response due to the enzyme IgA-specific serine endopeptidase can lead to developing inflammation and penetration of various pathogens into enterocytes. Thus, our and others study results indicate the controversial importance and a need to further investigate *S. wadsworthensis* both in obesity and other gastrointestinal diseases.

Key words: *Sutterella wadsworthensis*, children, obesity, fecal microbiota, inflammatory bowel disease, anaerobes.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ *SUTTERELLA WADSWORTHENSIS* В ФЕКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЕ ДЕТЕЙ С ОЖИРЕНИЕМ

Скворцова О.В., Каюмов К.А., Уливанова В.А., Алексеев Д.В., Лямин А.В., Мигачева Н.Б., Исмагуллин Д.Д.
ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Самара, Россия

Резюме. *Sutterella wadsworthensis* является грамотрицательной, неспорообразующей, желчустойчивой, микроаэрофильной бактерией. Одним из важнейших биохимических свойств *S. wadsworthensis* является наличие фермента IgA-специфической сериновой эндопептидазы. В научной литературе *Sutterella* spp. связывают с язвенным колитом, расстройством аутистического спектра и ожирением у детей. Более того, проанализировав

Адрес для переписки:

Каюмов Карим Аскерович
443079, Россия, г. Самара, ул. Гагарина, 18,
ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский
университет Минздрава РФ.
Тел.: 8 (927) 739-64-11. Факс: 8 (846) 333-29-76.
E-mail: k.a.kayumov@samsmu.ru

Contacts:

Karim A. Kayumov
443079, Russian Federation, Samara, Gagarina str., 18,
Samara State Medical University of the Ministry of Health of Russia.
Phone: +7 (927) 739-64-11. Fax: +7 (846) 333-29-76.
E-mail: k.a.kayumov@samsmu.ru

Для цитирования:

Скворцова О.В., Каюмов К.А., Уливанова В.А., Алексеев Д.В., Лямин А.В., Мигачева Н.Б., Исмагуллин Д.Д. Распространенность *Sutterella wadsworthensis* в фекальной микробиоте детей с ожирением // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 187–190. doi: 10.15789/2220-7619-POS-16600

Citation:

Skvortsova O.V., Kaiumov K.A., Ulivanova V.A., Alekseev D.V., Lyamin A.V., Migacheva N.B., Ismatullin D.D. Prevalence of *Sutterella wadsworthensis* in the fecal microbiota of obese children // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 187–190. doi: 10.15789/2220-7619-POS-16600

различные клинические осложнения у пациентов с ожирением, было установлено, что *Sutterella* spp. влияет на увеличение резистентности к инсулину, что впоследствии ведет к развитию сахарного диабета 2 типа. В данном исследовании был проанализирован фекальный микробиом 156 пациентов педиатрического отделения, из которых 23 ребенка составляют контрольную группу, 23 — группу с ожирением без сопутствующей патологии, 110 детей с ожирением и сопутствующей патологией. Целью исследования было определить корреляцию микроорганизма *S. wadsworthensis* с типами ожирения у детей и его роль в развитии данного заболевания. В результате выявлена прямая взаимосвязь между выделенной палочкой и ожирением без сопутствующей патологии у девочек в возрасте от 14 до 17 лет, также получены данные о том, что *S. wadsworthensis* достоверно чаще высевалась у мальчиков. Кроме того, было решено провести анализ микроорганизмов, ассоциированных с *S. wadsworthensis*, с целью выявления представителей микробиома, характерных для людей с ожирением. При статистической обработке найдена достоверно значимая положительная корреляция с выделением *Streptococcus* spp., *S. anginosus*, *C. perfringens*, *S. aureus* и *W. confusa*. К тому же способность *S. wadsworthensis* снижать функциональность кишечного антибактериального иммунного ответа за счет фермента IgA-специфической сериновой эндопептидазы может приводить к развитию воспаления и проникновению к энтероцитам различных патобионтов. Таким образом, итоги нашего и других исследований в научном сообществе говорят о противоречивом значении и необходимости дальнейшего изучения *S. wadsworthensis* как в контексте ожирения, так и других заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Ключевые слова: *Sutterella wadsworthensis*, дети, ожирение, фекальная микробиота, воспалительные заболевания кишечника, анаэробы.

Sutterella wadsworthensis belongs to the *Sutterella* spp., family *Sutterellaceae*, order *Burkholderiales*, class *Betaproteobacteria*. Microorganisms of this species are gram-negative, non-spore-forming, bile-resistant, microaerophilic bacteria. They have two main forms: bacilli and coccobacilli. Spiral and filamentous morphotypes are also found [4].

Chocolate or brucella agars are used for cultivation of *Sutterella* spp. Incubation requires anaerobic or microaerophilic conditions and 48–72 hours of time [7]. *Sutterella* spp. are not saccharolytic. They show negative results for catalase, urease and oxidase, and are also capable of reducing nitrates to nitrites. These bacteria have enzymes such as esterase, L-arginine-arylamidase and L-aspartate-arylamidase [4, 7].

S. wadsworthensis is able to attach to mucus and proteins of extracellular matrix, such as laminin, type 1 collagen, fibronectin. Such adhesion factors, along with resistance to the bile acids, determine their localization in the duodenum and bile ducts [1]. According to this fact, the preferred material for collection in order to detect *S. wadsworthensis* will be a biopsy material of the mucous membrane, rather than feces samples.

One of the most important biochemical properties of *S. wadsworthensis* is the presence of the enzyme called IgA-specific serine endopeptidase [2]. The main function of IgA is to protect the epithelial cells of the mucous membranes from the pathogenic microorganisms by hindering adhesion, so its destruction can lead to infection of epithelial cells. In 2015 a study was published, in which the authors observed a low level of IgA in animals with a high content of *Sutterella* spp., and a high level of IgA in animals with a low content of *Sutterella* spp. It was also found in that research that the ability of bacteria to destroy IgA components leads to an increase

in intestines ulceration in animals with the injection of sodium dextran sulfate [3].

A study of the microbiota in patients with ulcerative colitis, published in 2020, revealed the influence of *S. wadsworthensis* on the development of this disease. According to its results, patients with a high content of *Sutterella* spp., who underwent fecal microbiota transplantation, did not have endoscopic remission, while patients with low content of these microorganisms achieved it without taking corticosteroids [2]. In addition, *Sutterella* spp. is found in the material of patients with appendicitis and peritonitis. At the same time, in 2018, a study of patients with Crohn's disease showed a small biodiversity of the intestinal microbiota and a reduced number of *Sutterella* spp. [6]. There is a connection between *Sutterella* spp. and autism spectrum disorder (ASD). In a study, conducted in 2012, an analysis using a protein immunoblot revealed the reactivity of IgG or IgM to *Sutterella* spp. antigens in 11 patients with ASD, while in the control group only one individual had weak IgG reactivity. Despite the fact that already in 2013 the assumption about the specificity of these microorganisms for children with ASD was refuted, the question of immunoreactivity in patients with this disorder requires further study [8].

In July 2023 an article was published, in which the authors established a direct connection between *Sutterella* spp. and obesity in pediatric patients, as well as an inverse connection in adult patients. Moreover, after analyzing various clinical complications in patients with obesity, the effect of *Sutterella* spp. was claimed to increase insulin resistance, which subsequently leads to the emergence of type 2 diabetes mellitus. The effect of the microbiome on insulin resistance was also confirmed after transplantation of fecal microbiota from lean donors to patients with metabolic syndrome. Transplantation caused

an increase in the sensitivity of cells to insulin, as well as an increase in the diversity of various taxa of microorganisms [5].

All of the above data indicate the contradictory role of *S. wadsworthensis* in the pathogenesis of various human diseases, therefore further studies in this direction are required.

The purpose of this work is to analyze the frequency of *S. wadsworthensis* in children with various types of obesity, as well as to find an answer whether *Sutterella* spp. is an etiological factor in the development of this pathology or is a part of the normal human microbiome.

Materials and methods

The study involved 156 children, aged from 7 to 17 years. 23 children were included in the control group, 23 children — in the group with obesity without concomitant pathology, and 110 children — in the group with obesity and concomitant pathology. 63 (40.4%) of included individuals were girls and 93 (59.6%) were boys.

To analyze the species diversity of the intestinal microbiota in children, 156 feces samples were seeded on 7 different nutrient media: Rogosa SL Agar (HiMedia, India), Urinary Tract Infections Chromogenic Agar (CondaLab, Spain), Bifidobacterium Agar (HiMedia, India), Clostridial Agar (HiMedia, India), Anaerobic Agar (HiMedia, India), Brucella Agar (HiMedia, India) with the addition of 10% mutton blood, Veillonella Agar (HiMedia, India). Cultivation was carried out using the “BACTRON 300-2” anaerobic station (Sheldon, USA) during 7 days. Identification of cultivated microorganisms was performed using a MALDI-ToF mass-spectrometer (Bruker, Germany).

Statistical analysis was carried out using the Stat Tech v. 3.1.8 program (Stattech LLC, Russia). Quantitative indicators were evaluated for compliance with the normal distribution using the Shapiro–Wilk criterion (with the number of subjects less than 50) or the Kolmogorov–Smirnov criterion (with the number of subjects more than 50). Quantitative data were described using median (Me) and lower and upper quartiles (Q_1 – Q_3) in the absence of a normal distribution. Categorical data were described with absolute values and percentages. The percentages in the analysis of four-field conjugacy tables were compared using Pearson’s chi-squared criterion (with values of the expected phenomenon greater than 10) and Fisher’s exact criterion (with values of the expected phenomenon less than 10).

Results and discussion

According to the results of the intestinal microbiota analysis, *S. wadsworthensis* was detected in 18 (11.5%) children out of 156. In the control group, this

microorganism was isolated in 2 (8.7%) cases, in group of children with obesity without concomitant pathology in 3 (13%) cases, and in children with obesity and with concomitant pathology in 13 (11.8%) cases.

Having divided all the examined children by gender and age (7–9 years old; 10–13 years old; 14–17 years old) we analyzed the results of the study for reliable correlations with the isolation of *S. wadsworthensis*. Statistical processing showed that *S. wadsworthensis* was significantly more often isolated from boys ($p = 0.029$). In addition, a direct connection was found between the isolation of microorganism and obesity without concomitant pathology in girls aged from 14 to 17 years ($p = 0.006$). However, further analysis of the correlation between the phenotype of the examined children and the isolation of *S. wadsworthensis* showed no significant results in any age group.

Considering the fact that in the scientific community obesity is assumed to correlate with various representatives of the intestinal microbiota, it was decided to conduct a statistical analysis to find out associations of *S. wadsworthensis* with other microorganisms. In general, *S. wadsworthensis* was isolated in samples along with such bacteria as *Clostridium perfringens*, *Clostridioides difficile*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium innocuum*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Parabacteroides distasonis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus constellatus*, *Candida albicans*, *Weissella confusa* and less often along with other microorganisms. During statistical processing, a significant positive correlation with the *Streptococcus* spp. was found ($p = 0.036$). In addition, a significant connection with *S. anginosus* was found ($p = 0.018$), the isolation of which was also positively correlated with *S. wadsworthensis*. A statistically significant positive correlation was also found for such microorganisms as *C. perfringens* ($p = 0.006$), *S. aureus* ($p = 0.003$) and *W. confusa* ($p = 0.035$).

A large number of data that have appeared in the scientific community claim ambiguous facts about the participation of *S. wadsworthensis* in various pathologies. In this study, we tried to find a reliable correlation of this microorganism with obesity in children, as well as to determine its possible role in the development of the disease. Statistical processing of our results showed that *S. wadsworthensis* was found mainly in boys. However, unlike the study in 2023, we were unable to find a statistically significant connection with obesity and concomitant diseases in the entire group of examined children. Nevertheless, after dividing the children into age groups, the results showed a reliable association of *S. wadsworthensis* with obesity without concomitant pathology in girls aged from 14 to 17 years. Although the statistical search for further correlations in children of other age groups did not reveal any significant connections, in our opinion, it is impossible to claim unequivocally whether

S. wadsworthensis is not an etiological factor involved in the development of obesity in children. In addition, it is important to consider the ability of *Sutterella* spp. to reduce the functionality of the intestinal antibacterial immune response. Due to disruption of the barrier function provided by IgA, *S. wadsworthensis* contributes to the emergence of inflammation, providing the penetration of various pathogens to enterocytes,

such as, for example, *C. perfringens*, *S. aureus* and *S. anginosus*. These bacteria in our study were statistically associated with the isolation of *S. wadsworthensis*. Overall, the results of the accumulated scientific data, as well as the results of our study, indicate the requirement for further study of *S. wadsworthensis* both in the context of obesity and other diseases of the gastrointestinal tract.

References

1. Hiippala K., Kainulainen V., Kalliomäki M., Arkkila P., Satokari R. Mucosal prevalence and interactions with the epithelium indicate commensalism of *Sutterella* spp. *Front. Microbiol.*, 2016, vol. 7: 1706. doi: 10.3389/fmicb.2016.01706
2. Kaakoush N.O. *Sutterella* species, IgA-degrading bacteria in ulcerative colitis. *Trends Microbiol.*, 2020, vol. 28, no. 7, pp. 519–522. doi: 10.1016/j.tim.2020.02.018
3. Moon C., Baldridge M.T., Wallace M.A., Burnham C.-A.D., Virgin H.W., Stappenbeck T.S. Vertically transmitted faecal IgA levels determine extra-chromosomal phenotypic variation. *Nature*, 2015, vol. 521, no. 7550, pp. 90–93. doi: 10.1038/nature14139
4. Mukhopadhyay I., Hansen R., Nicholl C.E., Alhaidan Y.A., John M., Thomson J.M., Berry S.H., Pattinson C., Stead D.A., Russell R.K., El-Omar E.M., Hold G.L. A comprehensive evaluation of colonic mucosal isolates of *Sutterella wadsworthensis* from inflammatory bowel disease. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 10: e27076. doi: 10.1371/journal.pone.0027076
5. Squillario M., Bonaretti C., La Valle A., Di Marco E., Piccolo G., Minuto N., Patti G., Napoli F., Bassi M., Maghnie M., d'Annunzio G., Biassoni R. Gut-microbiota in children and adolescents with obesity: inferred functional analysis and machine-learning algorithms to classify microorganisms. *Sci. Rep.*, 2023, vol. 13, no. 1: 11294. doi: 10.1038/s41598-023-36533-2
6. Wang Y., Gao X., Ghazlane A., Hu H., Li X., Xiao Y., Xiao Y., Li D., Yu G., Zhang T. Characteristics of faecal microbiota in paediatric Crohn's disease and their dynamic changes during infliximab therapy. *J. Crohns. Colitis*, 2018, vol. 12, no. 3, pp. 337–346. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx153
7. Wexler H.M., Reeves D., Summanen P.H., Molitoris E., McTeague M., Duncan J., Wilson K.H., Finegold S.M. *Sutterella wadsworthensis* gen. nov., sp. nov., bile-resistant microaerophilic *Campylobacter gracilis*-like clinical isolates. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1996, vol. 46, no. 1, pp. 252–258. doi: 10.1099/00207713-46-1-252
8. Williams B.L., Hornig M., Parekh T., Lipkin W.I. Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. *mBio*, 2012, vol. 3, no. 1: e00261-11. doi: 10.1128/mBio.00261-11

Авторы:

Скворцова О.В., аспирант кафедры педиатрии ИПО ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Каюмов К.А., специалист Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Уливанова В.А., студентка Института клинической медицины ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Алексеев Д.В., специалист Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Лямин А.В., д.м.н., директор Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Мигачева Н.Б., д.м.н., доцент, зав. кафедры педиатрии ИПО ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Исматуллин Д.Д., к.м.н., зав. лабораторией Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия.

Authors:

Skvortsova O.V., PhD Student, Department of Pediatrics Institute of Professional Education, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Kaiumov K.A., Specialist, Research and Educational Professional Center for Genetic and Laboratory Technologies, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Ulianova V.A., Student, Institute of Clinical Medicine, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Alekseev D.V., Specialist, Research and Educational Professional Center for Genetic and Laboratory Technologies, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Lyamin A.V., DSc (Medicine), Director of Research and Educational Professional Center for Genetic and Laboratory Technologies, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;
Migacheva N.B., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Pediatrics, Institute of Professional Education, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Ismatullin D.D., PhD (Medicine), Head of Laboratory of Research and Educational Professional Center for Genetic and Laboratory Technologies, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation.

A RARE CASE OF URINARY TRACT INFECTION BY *BURKHOLDERIA CEPACIA*

C. Seitopoulou^a, M. Stamouli^b, G. Kalliora^c, A. Mourtzikou^d

^a Nikea Prime Care Center, Nikea, Greece

^b Naval and Veterans Hospital of Athens, Athens, Greece

^c National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

^d GHNP “Agios Panteleimon”, Piraeus, Greece

Abstract. *Burkholderia cepacia* is a motile, aerobic, non-fermentative, gram-negative bacillus and has been widely documented as a lung pathogen in patients with cystic fibrosis and chronic granulomatous disease. It is documented as an important emerging cause of multi-drug resistant nosocomial infections, and an important cause of morbidity and mortality. A 64-year-old male patient visited the Nikea Primary Healthcare Center, Piraeus, Greece, referred by the family doctor (GP), for follow-up due a history of prostate cancer (patient on immunosuppression) and recurrent UTIs with subsequent admission to the hospital. Patient history revealed diabetes mellitus type 2, arterial hypertension, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, history of recurrent UTIs, with 4 hospitalizations in a tertiary hospital during the last 2 years, prostatic hypertrophy, 2 episodes of prostatitis before the diagnosis of prostate cancer Gleason score 6, at the end of 2019, with subsequent total prostatectomy, and radiotherapy. Patient history also revealed dysuria, frequent urination, pain and burning sensation during urination and erectile dysfunction. Urinalysis showed intense pyuria, abundance of microorganisms and abundance of red blood cells. The urine culture grew monomicrobial *Burkholderia cepacia* > 10⁵ CFU/ml. The bacterium was identified by the RapID™ REMEL ONE identification system (Thermo Fisher Scientific). Antimicrobial susceptibility testing revealed susceptibility to antibiotics such as, Ceftazidime, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Levofloxacin and Imipenem. The patient received treatment with Levofloxacin. *Burkholderia cepacia* infections outside the respiratory system are rare. Moreover, recurrent UTIs with *B. cepacia* is a rare finding, which highlights the importance of our study. UTIs with *B. cepacia* have been associated with bladder irrigation or use of contaminated hospital objects and liquids. *B. cepacia* is one of the most antimicrobial-resistant organisms and treatment options are limited. The patient was treated with Levofloxacin (3rd generation fluoroquinolone — Tavanic) 500 mg daily per os for 2 weeks, due to his history.

Key words: *Burkholderia cepacia*, urinary tract infection, monomicrobial, morbidity, mortality, susceptibility, respiratory system, treatment.

РЕДКИЙ СЛУЧАЙ ИНФЕКЦИИ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ, ВЫЗВАННОЙ *BURKHOLDERIA CEPACIA*

Сейтопулу К.¹, Стамули М.², Каллиора Г.³, Мурзику А.⁴

¹ Центр первичной помощи, г. Никея, Греция

² Госпиталь военно-морских сил и ветеранов Афин, Афины, Греция

³ Афинский национальный университет имени Каподистрии, Афины, Греция

⁴ «Агиос Пантелеймон», г. Пирей, Греция

Резюме. *Burkholderia cepacia* представляет собой подвижную, аэробную, неферментирующую грамотрицательную палочку. Этот патоген широко известен в качестве возбудителя бронхо-легочных инфекций у паци-

Адрес для переписки:

Антония Мурзику
Адрес: 18454, Греция, г. Пирей, ул. Мантувалу, 3,
«Агиос Пантелеймон».
Тел.: +302132077000
E-mail: antoniamour@yahoo.com

Contacts:

Antonia Mourtzikou
18454, Greece, Piraeus, Mantouvalou 3, GHNP “Agios Panteleimon”.
Phone: +302132077000.
E-mail: antoniamour@yahoo.com

Для цитирования:

Сейтопулу К., Стамули М., Каллиора Г., Мурзику А. Редкий случай инфекции мочевых путей, вызванной *Burkholderia cepacia* // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 191–194. doi: 10.15789/2220-7619-RAC-12108

Citation:

Seitopoulou C., Stamouli M., Kalliora G., Mourtzikou A. A rare case of urinary tract infection by *Burkholderia cepacia* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 191–194. doi: 10.15789/2220-7619-RAC-12108

ентов с муковисцидозом и хронической гранулематозной болезнью, а также внутрибольничных инфекций с множественной лекарственной устойчивостью, высоким уровнем заболеваемости и смертности. 64-летний пациент мужского пола посетил Центр первичной медико-санитарной помощи Никеа, Пирей, Греция, по направлению семейного врача для наблюдения в связи с раком простаты (пациент с иммуносупрессией) и рецидивирующими инфекциями мочевых путей (ИМП) и был госпитализирован. В анамнезе: сахарный диабет 2 типа, артериальная гипертензия, гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, рецидивирующие ИМП, 4 госпитализации в специализированную больницу третичного звена за последние 2 года, гипертрофия предстательной железы, 2 эпизода простатита в конце 2019 г. до установления диагноза рака простаты (6 баллов по шкале Глисона), с последующей тотальной простатэктомией и лучевой терапией. Предъявлял жалобы на частые мочеиспускания, сопровождавшиеся болью и жжением, эректильную дисфункцию. Анализ мочи выявил выраженную пиурию, обилие микроорганизмов и эритроцитов. В посевах мочи обнаружены *Burkholderia cepacia* > 10⁵ КОЕ/мл. Вид бактерии был идентифицирован с помощью системы RapID™ REMEL ONE (Thermo Fisher Scientific). Была установлена чувствительность возбудителя к цефтазидиму, ципрофлоксацину, норфлоксацину, левофлоксацину и имипенему. Пациент получал лечение препаратом левофлоксацина (Таваник, по 500 мг ежедневно перорально в течение 2 недель). Инфекция *Burkholderia cepacia* за пределами респираторного тракта встречается редко. Более того, мономикробные рецидивы ИМП, вызванные *B. cepacia*, являются редкой находкой, что подчеркивает важность представленного исследования. ИМП, вызванные *B. cepacia*, были связаны с промыванием мочевого пузыря или использованием загрязненных больничных предметов и жидкостей. *B. cepacia* является одним из наиболее устойчивых к противомикробным препаратам микроорганизмов, поэтому возможности лечения инфекций, обусловленных этим патогеном, сильно ограничены.

Ключевые слова: *Burkholderia cepacia*, инфекция мочевыводящих путей, мономикробная инфекция, заболеваемость, смертность, восприимчивость, респираторная система, лечение.

Introduction

B. cepacia was discovered by Walter Burkholder in 1949 as the cause of onion skin rot, and first described as a human pathogen in the 1950s. It was first isolated in patients with cystic fibrosis (CF) in 1977, when it was known as *Pseudomonas cepacia*. In the 1980s, outbreaks of *B. cepacia* in individuals with CF were associated with a 35% death rate. *B. cepacia* has a large genome, containing twice the amount of genetic material as *E. coli*.

Burkholderia cepacia is a motile, aerobic, non-fermentative, gram-negative bacillus with multi-trichous polar flagella, found in various soil and aquatic environments. It has been widely documented as a lung pathogen in patients with cystic fibrosis and chronic granulomatous disease and is associated with fatal outcomes. Moreover, recently it is documented as an important emerging cause of multi-drug resistant nosocomial infections and consequently, as an important cause of morbidity and mortality [3, 6]. The aim of our study is to present a case of urinary tract infection (UTI) caused by *Burkholderia cepacia*.

Burkholderia cepacia complex (BCC) is a species complex consisting of *Burkholderia cepacia* and at least 20 different biochemically similar species of Gram-negative bacteria. They are catalase-producing and lactose-nonfermenting. Members of BCC are opportunistic human pathogens that most often cause pneumonia in immunocompromised individuals with underlying lung disease. Patients with sickle-cell haemoglobinopathies are also at risk.

The group includes *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis*, *B. stabilis*, *B. ambifaria*, *B. dolosa*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia* and *B. ubonensis*, among other species.

Treatment typically includes multiple antibiotics and may include ceftazidime, minocycline, piperacillin, meropenem, chloramphenicol, and trimethoprim/sulfamethoxazole (co-trimoxazole). Although co-trimoxazole has been generally considered the drug of choice for *B. cepacia* infections, ceftazidime, minocycline, piperacillin, and meropenem are considered to be viable alternative options in cases where co-trimoxazole cannot be administered because of hypersensitivity reactions, intolerance, or resistance. Newer beta-lactam/beta-lactamase combinations like ceftazidime-avibactam or ceftolozane-tazobactam can also be effective. BCC intrinsically resistant to colistin and usually resistant to aminoglycosides.

Case report

A 64-year-old male patient visited the Nikea Primary Healthcare Center, Piraeus, Greece, referred by the family doctor, for follow-up due a history of prostate cancer (patient on immunosuppression) and recurrent UTIs with subsequent admission to the hospital. Patient history revealed diabetes mellitus type 2, arterial hypertension, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, history of recurrent UTIs, with 4 hospitalizations in a tertiary hospital during the last 2 years, prostatic hypertrophy, 2 episodes of prostatitis before the diag-

remel

ERIC™ Electronic RapID Compendium

Laboratory: My Laboratory
User: adminRef No: 23.0000183
Report Date: 1/3/2023

RapID NF Plus

Identification Report

Microcode: 410010

- ADH	+ PHS	- aGLU	- GLU	+ GGT	- IND
- TRD	- NAG	- ONPG	- PRO	- TRY	- NO3
+ EST	- aGLU	- URE	- PYR	- BANA	- OXI

IDENTIFICATION = *Burk. cepacia*

Choice(s)	Probability	Bioscore	Contraindicated Tests
Burk. cepacia	100,00%	1/22	None
Probability Level: Satisfactory		BioFrequency: Acceptable	

Isolated from a variety of clinical materials. Opportunistic and often associated with nosocomial infections and cystic fibrosis. May produce a yellow-green pigment. RNA group II. Member of the Pseudomallei group.

Figure. Identification of *Burkholderia cepacia* by RapID™ REMEL ONE

nosis of prostate cancer Gleason score 6, at the end of 2019, with subsequent total prostatectomy, and radiotherapy. Patient history also revealed dysuria, frequent urination, pain and burning sensation during urination and erectile dysfunction. For the recurrent UTIs he had received initially antimicrobial treatment *per os*, for *Pseudomonas* spp. There is no further evidence of the antimicrobial treatment he received prior to his admissions to hospital (4 admissions in the last 2 years). On his last admission he received antimicrobial treatment for pseudomonas, his condition improved and he was discharged from the hospital with some of his symptoms persisting, but he does not remember the antimicrobial treatment he received there. However, on worsening of his condition, with subsequent high fever, elevation of CRP, ferritin and ESR values, as well as elevation of leucocyte count, he was admitted to the hospital and received intravenous antimicrobial treatment. The performed urinalysis (Multistix 10 SG Reagent Strips, Siemens Healthineers) and urine culture (incubation at 37°C for 24 hours on MacConkey agar, Columbia blood agar, and Sabouraud dextrose agar for fungi) took place at the Laboratory of Biopathology of Nikea Prime Care Center. We have no information on the diagnosis of the urine culture done at the hospital where the patient was hospitalized.

Results

Urinalysis showed intense pyuria, abundance of micro-organisms and abundance of red blood cells. The urine culture grew monomicrobial *Burkholderia cepacia* > 10⁵ CFU/ml. The bacterium was identified by the RapID™ REMEL ONE identification

system (Thermo Fisher Scientific) (see Figure). Antimicrobial susceptibility testing revealed susceptibility to Ceftazidime, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Levofloxacin and Imipenem. The patient was treated with Levofloxacin (3rd generation fluoroquinolone — Tavanic) 500 mg daily *per os* for 2 weeks, due to his history, and recovered [1].

Discussion

Burkholderia cepacia infections outside the respiratory system are rare. Moreover, recurrent UTIs with *B. cepacia* is a rare finding, which highlights the importance of our study. UTIs with *B. cepacia* have been associated with bladder irrigation or use of contaminated hospital objects and liquids [2, 4, 5]. *Pseudomonas* spp. and *Burkholderia* spp. have been previously classified in the same genus. Given that they have similar biochemical properties, *Burkholderia* can be mislabeled as *Pseudomonas*, as occurred with the patient in our study. *B. cepacia* is one of the most antimicrobial-resistant organisms and treatment options are limited [2, 4, 5]. The patient does not specify on whose orders he was treated for pseudomonas, at that time he was seen for prostate cancer by a urologist and an oncologist, as well as a diabetologist for diabetes mellitus. In general, this is a patient who has suffered a great deal because of his history.

Conclusion

Burkholderia cepacia is a motile, aerobic, non-fermentative, gram-negative bacillus and has been widely documented as a lung pathogen in patients with cystic fibrosis and chronic granulomatous dis-

ease. It is documented as an important emerging cause of multi-drug resistant nosocomial infections, and an important cause of morbidity and mortality.

Diagnosis of infectious diseases, especially in immunodeficiency patients and particularly in urinary

tract is of great importance. Early and accurate identification of *B. cepacia* help patients' management with proper therapeutic intervention. The critical opinion of doctor microbiologist can help in differential diagnosis among microbes of the same group.

References

1. Agyepong N., Govinden U., Owusu-Ofori A., Essack S.Y. Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in a teaching hospital in Ghana. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.*, 2018, vol. 7, no. 37, pp. 1–8. doi: 10.1186/s13756-018-0324-2
2. Du M., Song L., Wang Y., Suo J., Bai Y., Xing Y., Xie L., Liu B., Li L., Luo Y., Liu Y.. Investigation and control of an outbreak of urinary tract infections caused by Burkholderia cepacia-contaminated anesthetic gel. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.*, 2021, vol. 10, no. 1: 1. doi: 10.1186/s13756-020-00855-x
3. Kwayess R., Al Hariri H.E., Hindy J-R, Youssef N., Haddad S.F., Kanj S.S. Burkholderia cepacia infections at sites other than the respiratory tract: a large case series from a tertiary referral hospital in Lebanon. *J. Epidemiol. Glob. Health.*, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 274–280. doi: 10.1007/s44197-022-00048-2
4. Nimri L., Sulaiman M., Hani B.O. Community-acquired urinary tract infections caused by Burkholderia cepacia complex in patients with no underlying risk factors. *JMM Case Reports*, 2017, vol. 4, no. 1: e005081. doi: 10.1099/jmmcr.0.005081
5. Song J.E., Kwak Y.G., Um T.H., Cho C.R., Kim S., Park I.S., Hwang J.H., Kim N., Oh G.B. Outbreak of Burkholderia cepacia pseudo bacteraemia caused by intrinsically contaminated commercial 0.5% chlorhexidine solution in neonatal intensive care units. *J. Hospit. Infect.*, 2018, vol. 98, no. 3, pp. 295–299. doi: 10.1016/j.jhin.2017.09.012
6. Wootton M., Davies L., Pitman K., Howe R.A. Evaluation of susceptibility testing methods for Burkholderia cepacia complex: a comparison of broth microdilution, agar dilution, gradient strip and EUCAST disc diffusion. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2021, vol. 27, no. 5: 788. doi: 10.1016/j.cmi.2020.11.012

Авторы:

Сейтопулу К., д.м.н., магистр в области гигиены труда и окружающей среды, доктор философии, биопатолог, лаборатория биопатологии, Центр первичной медико-санитарной помощи, г. Никея, Греция;

Стамули М., бакалавр, магистр в области управления здравоохранением, магистр всеобщего управления качества, Европейский специалист в области лабораторной медицины, директор лаборатории биохимии, Афинский госпиталь военно-морских сил и ветеранов («NNA»), Афины, Греция;

Каллиора Д., студентка биологического факультета Афинского национального университета имени Каподистрии (ЕКРА), Афины, Греция;

Мурцику А., бакалавр, магистр клинической химии, магистр общественного здравоохранения, магистр управления первичной медико-санитарной помощью, Европейский специалист в области лабораторной медицины, к.н., старший научный руководитель лаборатории молекулярной диагностики, GHNP «Агиос Пантелеймон», г. Пирей, Греция.

Authors:

Seitopoulou C., MD, MSc in Occupational and Environmental Health, PhD, Biopathologist, Laboratory of Biopathology, Nikea Prime Care Center, 2nd YPE, Nikea, Greece;

Stamouli M., BSc, MSc in Health management, MSc in TQM, EurSpLM, Director of Biochemistry Laboratory, Naval and Veterans Hospital of Athens ("NNA"), Athens, Greece;

Kalliora G., Student at Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens (EKPA), Athens, Greece;

Mourtzikou A., BSc, MSc in Clinical Chemistry, MPH, MPH, EurSpLM, PhD, Scientific Senior Supervisor, Laboratory of Molecular Diagnostics, GHNP "Agios Panteleimon", Piraeus, Greece.

Поступила в редакцию 24.05.2023
Отправлена на доработку 08.09.2023
Принята к печати 25.02.2024

Received 24.05.2023
Revision received 08.09.2023
Accepted 25.02.2024

ПАМЯТИ ИРИНЫ СОЛОМОНОВНЫ ФРЕЙДЛИН



Российская наука понесла тяжелую утрату. 23 января 2024 г. ушла из жизни доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ Ирина Соломоновна Фрейдлин.

И.С. Фрейдлин родилась 7 марта 1936 г. в Ленинграде. В 1959 г. она окончила Первый Ленинградский медицинский институт им. акад. И.П. Павлова по специальности «Лечебное дело». В стенах этого учебного заведения Ирина Соломоновна начала свою научную деятельность, обучалась в аспирантуре при кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии и в 1961 г. успешно защитила кандидатскую диссертацию «Фагоцитоз в противомикробной защите». Дальнейшая научно-педагогическая деятельность И.С. Фрейдлин также была тесно связана с Первым Санкт-Петербургским государственным медицинским университетом им. И.П. Павлова. С 1961 г. на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии И.С. Фрейдлин занимала должность ассистента, доцента (с 1968 г.) и профессора (с 1987 г.). В 1974 г. она успешно защитила докторскую диссертацию «Функции макрофагов и иммуногенез».

Все иммунологи страны знали Ирину Соломоновну как яркого специалиста и педагога. Ее многочисленные труды затрагивали разные области иммунологии и всей медицины. Они всегда были связаны с самыми актуальными и значимыми для фундаментальной науки и клиники проблемами, которые оказывались в разные годы в фокусе всеобщего внимания исследователей по всему миру. Уникальность подхода Ирины Соломоновны к решению любой научной проблемы состояла в ее удивительном даре сочетать в проводимых исследованиях огромную широту, видение самых далеких горизонтов любой проблемы с предельной методической тщательностью и бескомпромиссностью в анализе полученных результатов. Она порой вспоминала, что этот стиль был привит ей уже в самом начале ее научного пути, сразу после окончания Первого Ленинградского медицинского института, во время стажировки по инфекционной иммунологии в Институте Пастера в Париже, куда она поехала по приглашению великого Пьера Грабара.

Работы 1960–1970-х гг., посвященные системе мононуклеарных фагоцитов, намного опередили свое время. Сама постановка вопроса об огромной роли врожденного иммунитета в развитии всех форм иммунитета приобретенного казалась парадоксальной в то время, когда только формировались первые концепции межклеточной кооперации. Но развитие мировой науки, в том числе труды Ирины Соломоновны, в последующие годы доказали справедливость этого подхода и ее талант на-

учного предвидения, когда на рубеже тысячелетий Ч. Дженуэем и Р. Меджитовым были раскрыты механизмы активации макрофагов и их регуляторных воздействий на формирование реакций приобретенного иммунитета.

В 1970-е гг. И.С. Фрейдлин организовала факультативный курс по фундаментальной и клинической иммунологии, который регулярно читала для студентов на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии (до 2015 г.), в дальнейшем (с 2015 г.) — на кафедре иммунологии ПСПбГМУ им. И.П. Павлова.

Не менее важное место в жизни И.С. Фрейдлин занимал Институт экспериментальной медицины. В июне 1991 г. И.С. Фрейдлин возглавила отдел иммунологии Института, научный фундамент которого был заложен академиком РАМН В.И. Иоффе. Научный потенциал и организаторский талант Ирины Соломоновны придали мощный импульс развитию отдела, которым она руководила на протяжении 23 лет — до 2014 г, после чего продолжила работу в Институте в должности главного научного сотрудника.

Именно с периодом работы Ирины Соломоновны в Институте экспериментальной медицины связаны ее важнейшие успехи и достижения. Труды И.С. Фрейдлин внесли огромный вклад в развитие фундаментальных представлений о функционировании иммунной системы. Работы учеников ее школы легли в основу концепции сетевой цитокиновой регуляции, ставшей мейнстримом фундаментальной иммунологии и чрезвычайно востребованной всеми клиницистами. В 1997 г. И.С. Фрейдлин была удостоена почетного звания «Заслуженный деятель науки Российской Федерации», в 1999 г. ее избрали членом-корреспондентом Российской академии медицинских наук, с 2014 г. она стала членом-корреспондентом Российской академии наук.

В 1997 г. И.С. Фрейдлин стала первым председателем Правления Санкт-Петербургского регионального отделения Российской Ассоциации аллергологов и клинических иммунологов и возглавляла эту организацию более четверти века. Последние 30 лет входила в состав Президиума Российского Научного Общества Иммунологов. В 1999 г. И.С. Фрейдлин организовала и по настоящее время являлась главным редактором научного журнала «Медицинская иммунология», членом редколлегий журналов «Цитокины и воспаление», «Иммунология», «Russian Journal of Immunology», «Инфекция и иммунитет».

Благодаря ее инициативе в Санкт-Петербурге стали регулярно проводить масштабные иммунологические форумы. При этом она не оставляла преподавательскую деятельность, которую искренне любила и считала едва ли не главным делом своей жизни. Несмотря на сложный период в жизни страны и падение престижа научной работы, она смогла обеспечить приток научной молодежи, укрепить материально-техническую базу исследований, создать новые направления научной работы. Ирина Соломоновна создала научную школу по иммунологии, которая многие годы была одной из ведущих в стране. При ее научном консультировании и научном руководстве было выполнено 6 докторских и 28 кандидатских диссертаций. Ее ученики работают в ведущих научных и клинических центрах нашей страны и за рубежом. До последних лет своей жизни она продолжала читать блестящие лекции для заинтересованных в получении знаний студентов профильных вузов. И.С. Фрейдлин является автором и соавтором более 235 печатных работ в ведущих отечественных и зарубежных журналах, 12 монографий и 5 учебников.

Все, кто имел счастье вместе работать и общаться с Ириной Соломоновной, знают, сколь интересным и вдохновляющим было это общение. Будучи жителем блокадного Ленинграда и пережив ужасы первой блокадной зимы, она не понаслышке знала, насколько важны подбадривающее слово или дружеский совет в трудную минуту. Любой сотрудник отдела мог рассчитывать на реальную помощь и поддержку со стороны Ирины Соломоновны в научных и в житейских делах. Ее открытость для общения, неподдельная доброта и высочайший уровень культуры располагали к ней всех собеседников. Особой поддержкой И.С. Фрейдлин всегда пользовалась научная молодежь.

Светлая память об Ирине Соломоновне Фрейдлин навсегда останется в сердцах коллег, учеников, близких людей. Ее научное наследие войдет в золотой фонд российской и мировой иммунологии.

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».

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абовян Р.А.	163	Мокриевич А.Н.	9	Canh H.D.	133
Аветисян Ш.М.	163	Мясникова И.А.	24	Destriani S.N.	155
Андреева Н.П.	57	Настаева Н.Ю.	57	Farida U.	155
Ануфриева Е.В.	86	Останкова Ю.В.	86	Grigorieva S.A.	115
Афридонова З.Э.	35	Палозян Г.О.	163	Hassannezhad M.	95
Вяткин И.Н.	181	Парамонова Н.М.	24	Ismatullin D.D.	187
Гладкова Л.С.	57	Пегушина О.Г.	103	Jahani S.	95
Горелова Г.В.	170	Печеник А.С.	46	Kaiumov K.A.	187
Дагиль Ю.А.	57	Плужников Н.Н.	24	Kalgina G.A.	115
Дедков В.Г.	66	Полев Д.Е.	66	Kalliora G.	191
Долгова А.С.	66	Прокопьев В.В.	175	Karimian E.	125
Дьякова М.Е.	77	Рейнгардт Д.Э.	86	Khatami M.	125
Зиминова А.А.	181	Сайтова А.Т.	66	Kurlaeva L.V.	115
Ильинский Н.С.	24	Сафронов В.А.	181	Kurniati N.	155
Камелева А.А.	57	Семенов А.В.	86	Lan L.T.P.	133
Каневский Б.А.	24	Семикина Е.Л.	35	Loi C.B.	133
Капитонова М.А.	66	Сергеевич В.И.	103	Lyamin A.V.	187
Кафтырева Л.А.	66	Серебряная Н.Б.	77	Manshadi S.A.D.	95
Качнова А.С.	57	Сиволодский Е.П.	170	Meidani M.	125
Конюхов А.В.	46	Солььева И.Л.	57	Migacheva N.B.	187
Костинов М.П.	46, 57	Топтыгина А.П.	35	Mirzapour P.	125
Костинова А.М.	46, 57	Тотоян А.А.	86	Mourtzikou A.	191
Краева Л.А.	170	Тюнин М.А.	24	Novianti	155
Крюкова Н.О.	57	Чепур С.В.	24	Ozerova A.N.	115
Кудрявцева Л.Г.	103	Шабалина А.В.	66	Saputra M.K.F.	155
Кудрявцева Т.Ю.	9	Эсмедляева Д.С.	77	Seitopoulou C.	191
Кузнецова М.В.	103	Юшкова С.В.	57	SeyedAlinaghi S.	95, 125
Куклев В.Е.	181	Яблонский П.К.	77	Shahmohamadi E.	95
Куклина Н.В.	175	Abbaspour F.	95	Skvortsova O.V.	187
Локтинова М.Н.	46, 57	Abdollahi A.	125	Stamouli M.	191
Лялина Л.В.	86	Abdolsalehi M.R.	95	Stepanova K.B.	115
Мазко О.Н.	175	Abdul Salam A.	141	Stepanova T.F.	115
Макарова М.А.	66	Aldossari H.M.	141	Sutriyawan A.	155
Макарова О.Г.	175	Alekseev D.V.	187	Thang T.D.	133
Мелик-Андреасян Г.Г.	163	Anh L.T.	133	Thang T.T.	133
Мельникова Е.В.	170	Asadi S.M.	95	Tu N.T.N.	133
Михайловская В.С.	103	Bakshantovskaya I.V.	115	Ulivanova V.A.	187
				Yusanti L.	155

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адьювантная гриппозная вакцина	57	опросник	163	fecal microbiota	187
антиоксидантная активность	175	оценка	163	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holartctica</i>	9
антитела	35	популяции лимфоцитов	77	genetic polymorphisms	115
антраниловая кислота	170	препараты прямого противовирусного действия	86	governorates and localities	141
аппарат Гольджи	24	промежуточный компартмент	24	HIV	95
Армения	163	прооксидантная активность	175	HIV infection	95
аскомицетные дрожжи	175	прорывной иммунитет	35	humidity	155
базидиомицетные дрожжи	175	профилактика инфекций и инфекционный контроль	163	immune system indicators	115
безопасность	57	психоневрологический стационар	163	immunogenicity	125
бензоат натрия	170	Саратовская область	181	inflammatory bowel disease	187
бета-лактамазы расширенного спектра	103	секвенирование	86	influenza vaccine	125
биовар	170	тигекцилин	170	innate immunity	115
брюшной тиф	66	тромбоциты	46	IPCAF	163
вакцинация	46	туберкулез	77	Iran	95
вирулентность	9	ферменты пуринового метаболизма	77	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	103, 133
вирус гепатита С	86	характеристика	163	LAMP	66
внутриклеточная локализация и репликация	9	чувствительность к антимикробным препаратам	170	lipid metabolism disorders	115
геноварианты	181	эндоплазматический ретикулум	24	major cities	141
генотип	86	эндосомно-лизосомная система	24	monomicrobial	191
гипервирулентность	103	эндотоксин	9	morbidity	191
грипп	57	эффективность вакцины	57	mortality	191
заболеваемость	181	<i>Acinetobacter baumannii</i>	170	neonatal sepsis	133
изотермическая амплификация	66	<i>Acinetobacter baumannii</i> bv. <i>tryptophandestrans</i>	170	obesity	187
иммуногенность	57	adaptive immunity	115	Omicron	181
иммунологическая память	35	adolescents	95	pediatric care	95
исходы терапии	77	affected locations	141	prevalence of dengue fever	155
карбапенемы	103	anaerobes	187	rainfall	155
кардиохирургический стационар	103	antimicrobial susceptibility	133	respiratory system	191
клеточный иммунитет	35	antiviral therapy	95	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	66
коинфекция ВИЧ+ВГС	86	<i>Burkholderia cepacia</i>	191	SARS-CoV-2	35
коронавирус	24	children	187	seasonal variation	141
лейкоциты	46	chronic opisthorchiasis	115	single dose	125
лимфоциты	46	climate	155	species	133
микобиота кишечника	175	contamination per 1000 persons	141	spread and increase	141
множественная лекарственная устойчивость	9	COVID-19	35, 46, 57, 181	<i>Staphylococcus aureus</i>	133
молекулярная диагностика	66	Delta	181	STBHUCCB_38510	66
молекулярное типирование	103	diabetes mellitus type II	115	susceptibility	191
мутации лекарственной устойчивости	86	double dose	125	<i>Sutterella wadsworthensis</i>	187
нейроны	24	effectiveness	125	temperature	155
общий анализ крови	46	<i>Escherichia coli</i>	133	transplant recipients	125
оксидативный стресс	175			treatment	191
				urinary tract infection	191
				wind velocity	155

Иллюстрации к статье «Географическое распространение инфекции COVID-19 в Саудовской Аравии» (авторы: Х.М. Альдоссари, А. Абдул Салам) (с. 141–154) (1-й фрагмент; продолжение см. на с. II)
Illustrations for the article “Geographical distribution of COVID-19 infection across Saudi Arabia” (authors: Aldossari H.M., Abdul Salam A.) (pp. 141–154) (1st fragment; continued on p. II)

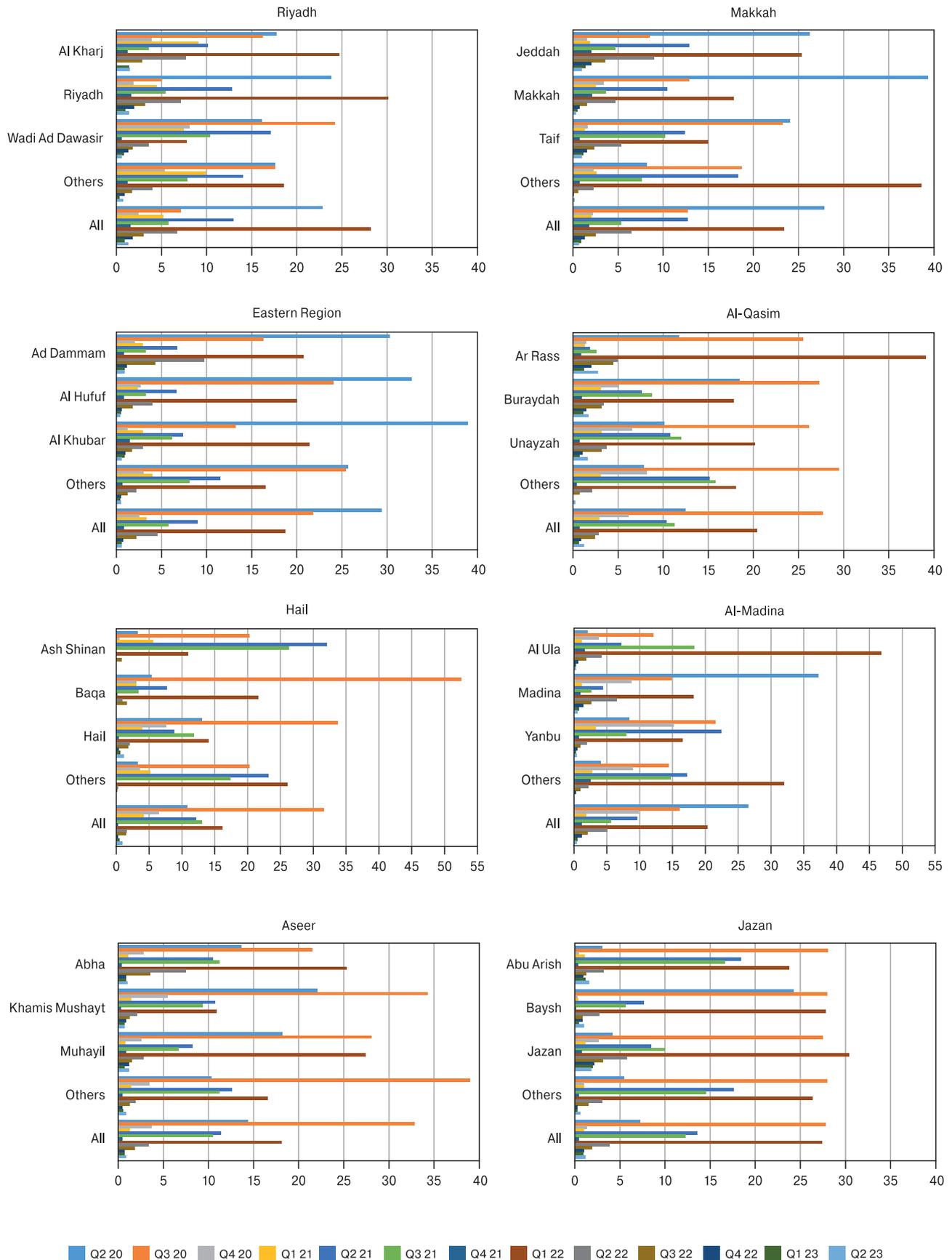


Figure 2. Percentage distribution of COVID-19 spread at various locations by administrative areas

Иллюстрации к статье «Географическое распространение инфекции COVID-19 в Саудовской Аравии» (авторы: Х.М. Альдоссари, А. Абдул Салам) (с. 141–154) (2-й фрагмент; начало см. на с. I)

Illustrations for the article “Geographical distribution of COVID-19 infection across Saudi Arabia” (authors: Aldossari H.M., Abdul Salam A.) (pp. 141–154) (2nd fragment; start on p. I)

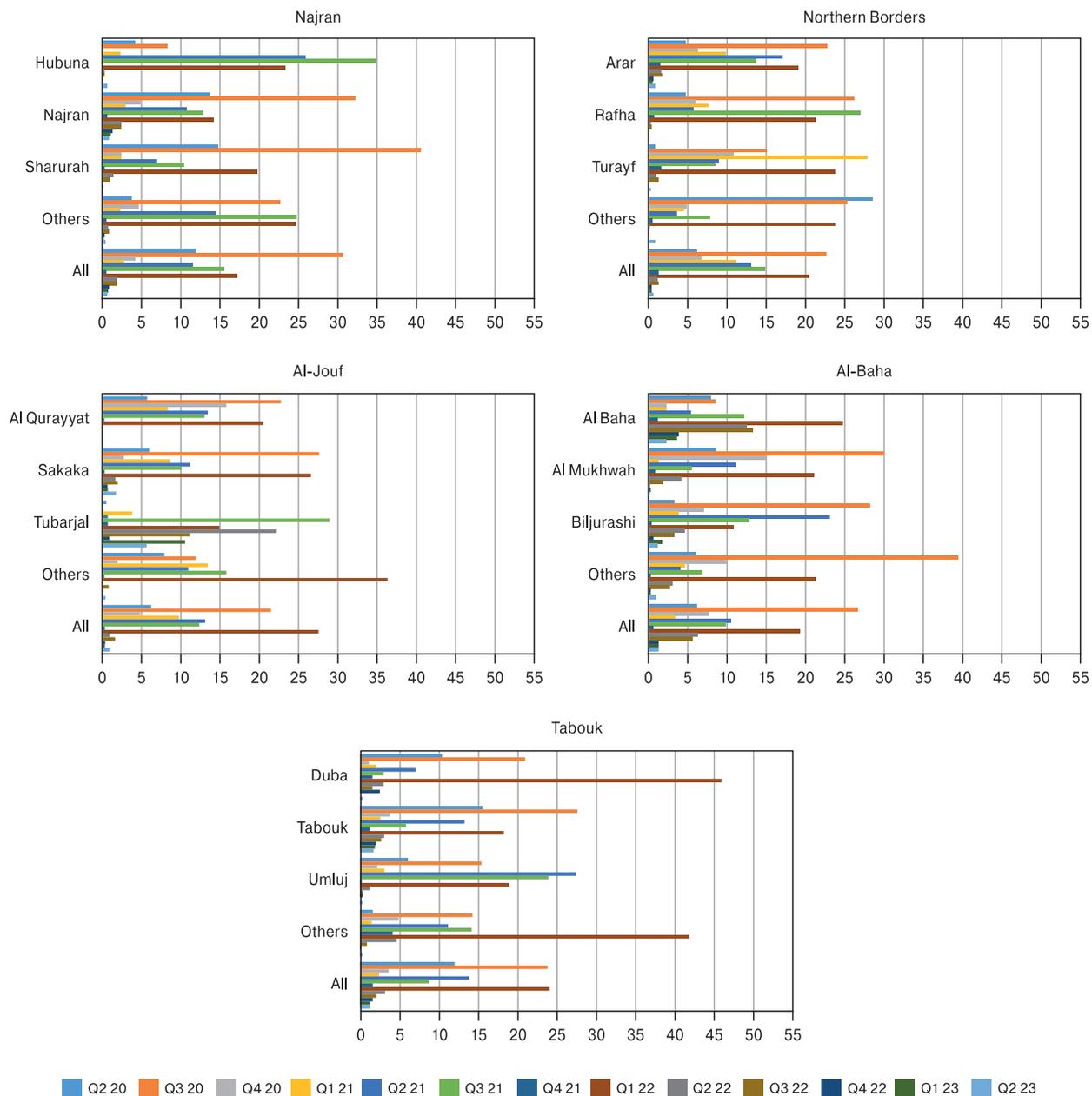


Figure 2. Percentage distribution of COVID-19 spread at various locations by administrative areas

Иллюстрация к статье «Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в условиях кардиохирургического стационара» (авторы: М.В. Кузнецова, В.И. Сергевнин, В.С. Михайловская, Л.Г. Кудрявцева, О.Г. Пегушина) (с. 103–114)

Illustration for the article “Microbiological and molecular genetic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates, extracted under conditions of cardiac surgery hospital” (authors: Kuznetsova M.V., Sergevnin V.I., Mihailovskaya V.S., Kudryavtseva L.G., Pegyshina O.G.) (pp. 103–114)

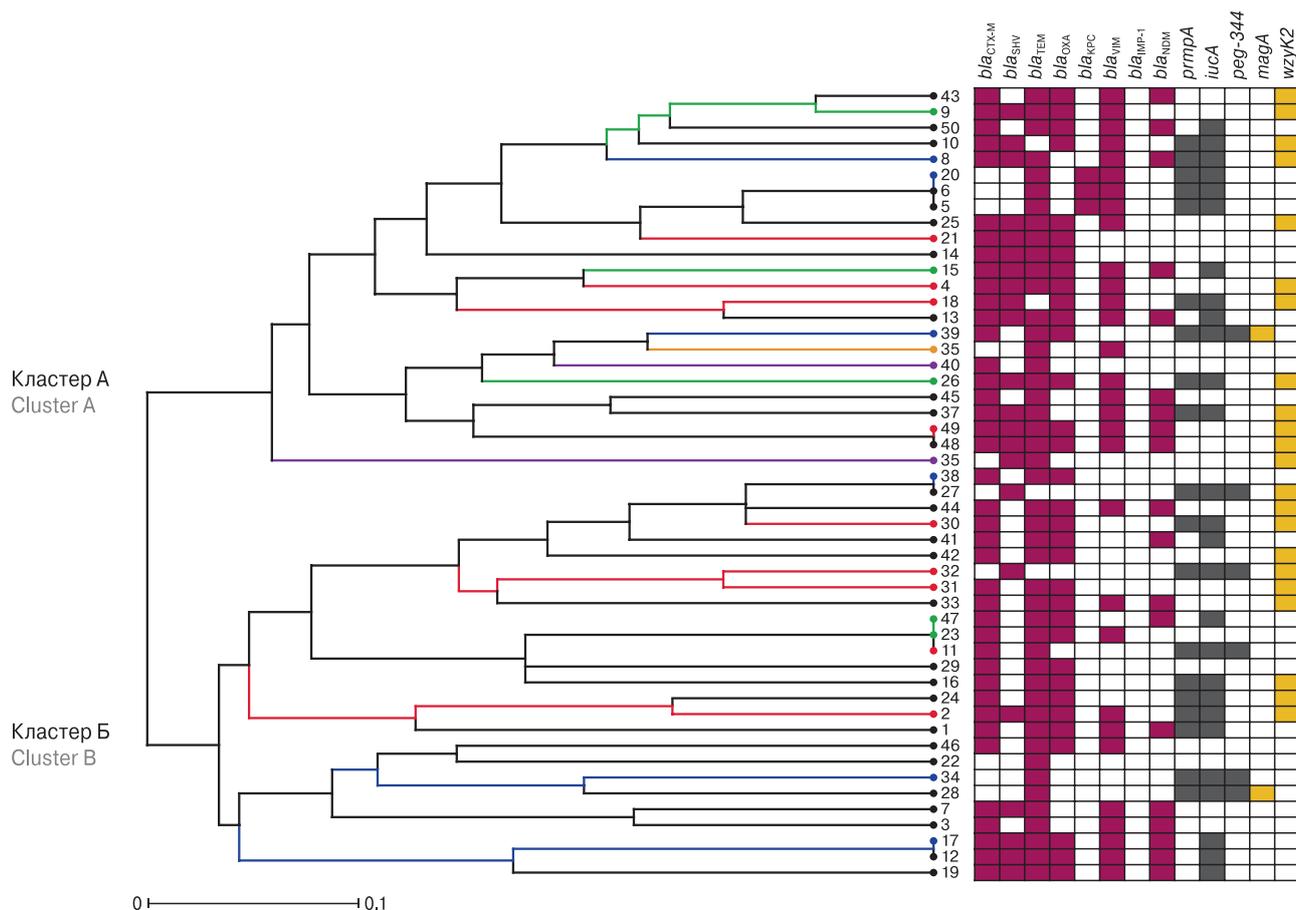


Рисунок. Дендрограмма, характеризующая филогенетические взаимоотношения изученных штаммов *K. pneumoniae*

Figure. Dendrogram of phylogenetic relations for the studied *K. pneumoniae* strains

Примечание. Шкала отражает процент сходства паттернов ERIC-типирования (n = 50). Цвета показывают тип отделения: черный — общая реанимация, красный — кардиохирургическое отделение № 1, синий — кардиохирургическое отделение № 2, оранжевый — кардиохирургическое отделение № 3, зеленый — палата интенсивной терапии кардиохирургического отделения № 4, фиолетовый — кардиохирургическое отделение № 4.

Note. The scale reflects the percent of similarity of ERIC-typing patterns (n = 50). The type of department is color coded: black — common intensive care unit, red — cardiac surgery department No. 1, blue — cardiac surgery department No. 2, orange — cardiac surgery department No. 3, green — intensive care unit of cardiac surgery department No. 4, purple — cardiac surgery department No. 4.

Подписной индекс:
Урал-Пресс – 41392

