

2024

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

Иллюстрация к статье «Аутоиммунные нарушения у больных гранулематозными заболеваниями после COVID-19: функционирование субпопуляций Т- и В-клеток» (авторы: А.А. Старшинова, И.В. Кудрявцев, А.А. Рубинштейн, А. Малкова, Х. Лин, М. Чжуан, А.Ю. Старшинова, И.Ф. Довгалюк, Д.А. Кудлай) (с. 251–267)

Illustration for the article “Autoimmune disorders in patients with granulomatosis diseases after COVID-19: T- and B-cells subsets function” (authors: Starshinova A.A., Kudryavtsev I.V., Rubinstein A.A., Malkova A., Ling H., Zhuang M., Starshinova A.Yu., Dovgaluk I.F., Kudlay D.A.) (pp. 251–267)

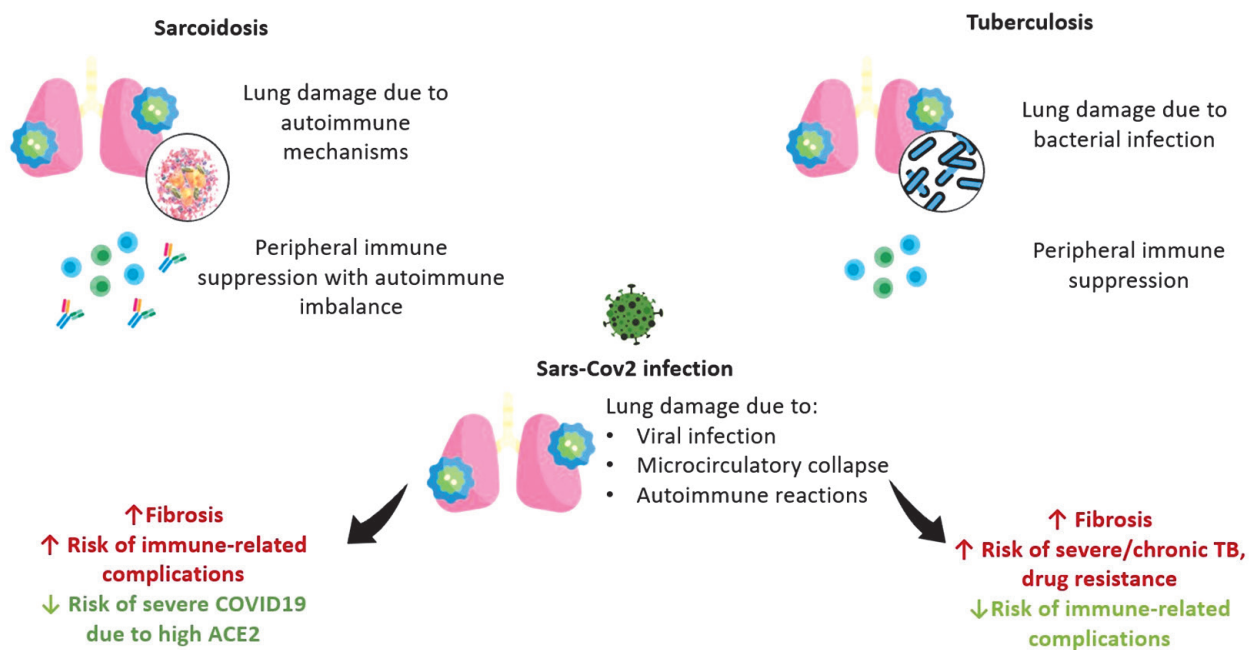


Figure. Scheme of immune response in COVID-19, sarcoidosis and tuberculosis

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

март–апрель

2024, том 14

№ 2

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
Лоуизр 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
Фрейдлин И.С. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
Черешнев В.А. д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель Института иммунологии и физиологии, Екатеринбург, Россия
Шпигель А. д.м.н., профессор, директор Института Пастера Камбоджи, Пномпень, Камбоджа

Редакционный совет

Алешкин В.А.	д.б.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия
Бухарин О.В.	д.м.н., профессор, академик РАН, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург, Россия
Вишневский Б.И.	д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия
Долгушин И.И.	д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент Южно-Уральского государственного медицинского университета, Челябинск, Россия
Зверев В.В.	д.б.н., профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
Кафтырева Л.А.	д.м.н., профессор, зав. лабораторией кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Кашкин К.П.	д.м.н., профессор, академик РАН, профессор кафедры иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования МЗ РФ, Москва, Россия
Кубарь О.И.	д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Малеев В.В.	д.м.н., профессор, академик РАН, советник директора Центрального НИИ эпидемиологии, зав. отделом инфекционной патологии, Москва, Россия
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 25.04.2024 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1100

© 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)

March–April

2024, volume 14

No. 2

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 25.04.2024. 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

Фазлалипур М., Моллаи Х.Р.

РОЛЬ РНК-ВИРУСОВ В ОНКОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА	209
---	-----

Оригинальные статьи

Талаев В.Ю., Новиков Д.В., Заиченко И.Е., Светлова М.В., Воронина Е.В., Бабайкина О.Н., Лапин В.А., Мелентьев Д.А., Новикова Н.А., Кашников А.Ю., Новиков В.В.

ХИМЕРНЫЕ ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ФРАГМЕНТ БЕЛКА ШИПА КОРОНАВИРУСА, СТИМУЛИРУЮТ СОЗРЕВАНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА	227
--	-----

Савин Т.В., Копать В.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р., Саенко А.И., Духовлинов И.В., Сысоева Г.М., Гамалей С.Г., Шимица Г.Г., Таранов О.С., Даниленко Е.Д., Симбирцев А.С., Тотолян А.А.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТА «КОРОНАДЕРМ-PS» ДЛЯ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2	238
--	-----

Старшинова А.А., Кудрявцев И.В., Рубинштейн А.А., Малкова А., Лин Х., Чжуан М., Старшинова А.Ю., Довгалько И.Ф., Кудлай Д.А.

АУТОИММУННЫЕ НАРУШЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ГРАНУЛЕМАТОЗНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОСЛЕ COVID-19: ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т- И В-КЛЕТОК	251
--	-----

Иванова И.А., Филиппенко А.В., Павлович Н.В., Аронова Н.В., Цимбалистова М.В., Анисимова А.С., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А., Чемисова О.С., Носков А.К.

ИММУННЫЙ СТАТУС ПАЦИЕНТОВ С ВНЕБОЛЬНИЧНЫМИ ПНЕВМОНИЯМИ, АССОЦИИРОВАННЫМИ С НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ И ДРУГИМИ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ	267
--	-----

Сафронова Э.А., Рябова Л.В., Зурочка А.В., Добрынина М.А.

ОСОБЕННОСТИ Т-КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ, БОЛЕВШИХ И НЕ БОЛЕВШИХ COVID-19, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ В-ЛИМФОЦИТОВ С ФЕНОТИПОМ CD3⁻CD19⁺CD5⁺ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ	277
--	-----

Решетникова И.Д., Тюрин Ю.А., Мустафин И.Г., Агафонова Е.В., Шайхрадиева Н.Д.

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ ТЕЧЕНИЯ COVID-19 В ГРУППЕ РИСКА «МЕДИЦИНСКИЕ РАБОТНИКИ»	289
---	-----

Горат Ф., Гандж Бахш А., Атаи Дисфани Р., Боргабани Р., Джаламбадани З.

АССОЦИАЦИЯ МЕЖДУ УПОТРЕБЛЕНИЕМ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК (ВИТАМИНОВ ИЛИ МИНЕРАЛОВ) И COVID-19 В ПЕРСИДСКОЙ КОГОРТЕ НАСЕЛЕНИЯ	299
---	-----

Лямин А.В., Винник А.В., Постников М.А., Винник С.В., Попов Н.В., Алексеев Д.В.

СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЙ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ПАЦИЕНТОВ С ПРОСТЫМ МАРГИНАЛЬНЫМ ГИНГИВИТОМ, ПЕРЕНЕСШИХ НОВУЮ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ	306
--	-----

Себа Д., Белаиде К.

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ УРОВНЯ ЛЕТАЛЬНОСТИ ПРИ COVID-19: ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ГИБРИДНЫХ МОДЕЛЕЙ	313
--	-----

Останкова Ю.В., Хуинх Х.К.Т., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Рейнгардт Д.Э., Давыденко В.С., Тотолян А.А.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГЕПАТИТА В У ДОНОРОВ КРОВИ ИЗ ЮЖНОГО ВЬЕТНАМА	320
---	-----

Ногойбаева К.А., Тобокалова С.Т., Боронбаева Э.К.

ПОТЕРЯННЫЕ ГОДЫ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЖИЗНИ, СВЯЗАННЫЕ С ГЕПАТИТОМ В ПРИ НАЛИЧИИ ИЛИ ОТСУТСТВИИ ДЕЛЬТА АГЕНТА, В КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ	331
---	-----

Самойлова А.А., Краева Л.А., Михайлов Н.В., Саитова А.Т., Полев Д.Е., Вашукова М.А., Гордеева С.А.,
Смирнова Е.В., Белятич Л.И., Долгова А.С., Шабалина А.В.

ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ВИРУЛЕНТНОСТИ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ KLEBSIELLA PNEUMONIAE	339
--	------------

Попкова М.И., Филатова Е.Н., Минаева С.В., Неумоина Н.В., Перфилова К.М., Уткин О.В.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ У ВЗРОСЛЫХ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ	351
--	------------

Аль-Нуайми В.А., Саллум Д.Ф.

УРОВЕНЬ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-3 (ММР-3) В СЫВОРОТКЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ, СВЯЗАННЫЙ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ	365
---	------------

Прокопенко П.И., Степанова Е.А., Матюшенко В.А., Чистякова А.К., Костромитина А.Д., Котомина Т.С.,
Рак А.Я., Рубинштейн А.А., Кудрявцев И.В., Новицкая В.В., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.

ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМНОГО И ЛОКАЛЬНОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА ЖИВУЮ ГРИППОЗНУЮ ВАКЦИНУ ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В СОСТАВ ВАКЦИННОГО ШТАММА ГЕНА НУКЛЕОПРОТЕИНА ОТ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА	371
---	------------

Краткие сообщения

Кривошеина Е.И., Карташов М.Ю., Найденова Е.В., Ушкаленко Н.Д., Свирин К.А., Ба М.Б., Нурдин И.,
Бумбали С., Терновой В.А.

ВЫЯВЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К НЕКОТОРЫМ ФЛАВИВИРУСАМ У НАСЕЛЕНИЯ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ	381
--	------------

Контаров Н.А., Бахромеева А.А., Долгова Е.И., Погарская И.В., Контарова Е.О., Юминова Н.В.

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИАЛЛИЛАМИНА В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ ГРИППА И ОРВИ В РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ	387
--	------------

В помощь практическому врачу

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

РЕДКИЙ СЛУЧАЙ ИНФЕКЦИИ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ, ВЫЗВАННОЙ STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA	392
---	------------

Правила для авторов	397
----------------------------------	------------

Авторский указатель	400
----------------------------------	------------

Предметный указатель	400
-----------------------------------	------------

CONTENTS

Reviews

Fazlalipour M., Mollaei H.R.

THE ROLE OF RNA VIRUSES IN HUMAN CANCERS 209

Original articles

Talayev V.Yu., Novikov D.V., Zaichenko I.Ye., Svetlova M.V., Voronina E.V., Babaykina O.N., Lapin V.A., Melentiev D.A., Novikova N.A., Kashnikov A.Yu., Novikov V.V.

CORONAVIRUS SPIKE PROTEIN FRAGMENT-CONTAINING CHIMERIC VIRUS-LIKE PARTICLES STIMULATE HUMAN DENDRITIC CELL MATURATION 227

Savin T.V., Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Dukhovlinov I.V., Sysoeva G.M., Gamaley S.G., Shimina G.G., Taranov O.S., Danilenko E.D., Simbirtsev A.S., Totolian A.A.

EXPERIMENTALLY INVESTIGATED “CORONADERM-PS”-DRIVEN SARS-CoV-2-SPECIFIC CELLULAR IMMUNITY AND SAFETY 238

Starshinova A.A., Kudryavtsev I.V., Rubinstein A.A., Malkova A., Ling H., Zhuang M., Starshinova A.Yu., Dovgaluk I.F., Kudlay D.A.

AUTOIMMUNE DISORDERS IN PATIENTS WITH GRANULOMATOSIS DISEASES AFTER COVID-19: T- AND B-CELLS SUBSETS FUNCTION 251

Ivanova I.A., Filippenko A.V., Pavlovich N.V., Aronova N.V., Tsimbalistova M.V., Anisimova A.S., Omelchenko N.D., Trufanova A.A., Chemisova O.S., Noskov A.K.

IMMUNE STATUS OF PATIENTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA ASSOCIATED WITH A NEW CORONAVIRUS INFECTION AND OTHER VIRAL AND BACTERIAL PATHOGENS 267

Safronova E.A., Ryabova L.V., Zurochka A.V., Dobrynina M.A.

FEATURES OF T-CELL AND HUMORAL IMMUNITY OF PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME, WITH AND WITHOUT COVID-19, DEPENDING ON/PERIPHERAL BLOOD B-LYMPHOCYTES WITH THE PHENOTYPE CD3⁺CD19⁺CD5⁺ LEVEL 277

Reshetnikova I.D., Tyurin Yu.A., Mustafin I.G., Agafonova E.V., Shaikhrazieva N.D.

ASSESSING MOLECULAR GENETIC AND IMMUNOLOGICAL PREDICTORS OF COVID-19 COURSE IN HEALTHCARE WORKER RISK GROUP 289

Ghorat F., Ganj Bakhsh A., Atee Disfani R., Borghabani R., Jalambadani Z.

THE ASSOCIATION BETWEEN THE HISTORY OF SUPPLEMENT USE (VITAMIN OR MINERAL) AND COVID-19 DISEASE IN THE PERSIAN COHORT POPULATION 299

Lyamin A.V., Vinnik A.V., Postnikov M.A., Vinnik S.V., Popov N.V., Alekseev D.V.

DENTAL AND MICROBIOLOGICAL STATUS OF COVID-19 CONVALESCENT PATIENTS WITH SIMPLE MARGINAL GINGIVITIS 306

Seba D., Belaide K.

FORECASTING INFECTION FATALITY RATE OF COVID-19: MEASURING THE EFFICIENCY OF SEVERAL HYBRID MODELS 313

Ostankova Yu.V., Huynh H.K.T., Serikova E.N., Shchemelev A.N., Reingardt D.E., Davydenko V.S., Totolian A.A.

MOLECULAR GENETIC CHARACTERIZATION OF HEPATITIS B VIRUS IN BLOOD DONORS FROM SOUTH VIETNAM 320

Nogoibaeva K.A., Tobokalova S.T., Boronbaeva E.K.

YEARS OF POTENTIAL LIFE LOST DUE TO HEPATITIS B WITH OR WITHOUT DELTA AGENT IN THE KYRGYZ REPUBLIC 331

Samoilova A.A., Kraeva L.A., Mikhailov N.V., Saitova A.T., Polev D.E., Vashukova M.A., Gordeeva S.A., Smirnova E.V., Beljatic L.I., Dolgova A.S., Shabalina A.V.

GENOMIC ANALYSIS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS VIRULENCE AND ANTIBIOTIC RESISTANCE 339

Popkova M.I., Filatova E.N., Minaeva S.V., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Utkin O.V.

QUANTITATIVELY ASSESSED BLOOD LEUKOCYTE EPSTEIN–BARR VIRUS IN ADULT HIV-INFECTED PATIENTS 351

Al-Nuaimy W.A., Salloom D.F.

MATRIX METALLOPROTEINASES-3 (MMP-3) SERUM LEVEL AND GENETIC POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH RHEUMATOID ARTHRITIS 365

Prokopenko P.I., Stepanova E.A., Matyushenko V.A., Chistyakova A.K., Kostromitina A.D., Kotomina T.S., Rak A.Ya., Rubinstein A.A., Kudryavtsev I.V., Novitskaya V.V., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N.

EPIDEMIC INFLUENZA VIRUS NUCLEOPROTEIN GENE INCORPORATED INTO VACCINE INFLUENZA VIRUS STRAIN GENOME TO OPTIMIZE SYSTEMIC AND LOCAL T-CELL IMMUNE RESPONSE AGAINST LIVE ATTENUATED INFLUENZA VACCINE 371

Short communications

Krivosheina E.I., Kartashov M.Yu., Naidenova E.V., Ushkalenko N.D., Svirin K.A., Bah M.B., Nourdine I., Boumbaly S., Ternovoy V.A.

IDENTIFICATION OF SPECIFIC IgG CLASS ANTIBODIES TO CERTAIN FLAVIVIRUSES IN THE POPULATION OF THE REPUBLIC OF GUINEA 381

Kontarov N.A., Bahromeeva A.A., Dolgova E.I., Pogarskaja I.V., Kontarova E.O., Juminova N.V.

POLYALLYLAMINE ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST INFLUENZA AND ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTION IN VARIOUS CELL CULTURES 387

For the physicians

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

CASE PRESENTATION OF URINARY TRACT INFECTION BY *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* 392

Instructions to Authors 397

Author index 400

Subject index 400

THE ROLE OF RNA VIRUSES IN HUMAN CANCERS

M. Fazlalipour^{a,b}, H.R. Mollaei^c

^a WHO Collaborating Center for Reference and Research on Rabies, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

^b Research Center for Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

^c Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Abstract. Many RNA viruses have been reported to be oncogenic (or carcinogenic) in a variety of animal and human cancers. The increase in the incidence and prevalence of cancer-causing viruses in human populations can be known as a key precursor to the development of various cancers. The retrovirus family and Hepatitis C virus (HCV) are also reported to cause cancer. Viral oncoproteins such as Tax of HTLV 1 interacts with cellular ubiquitination complex such as cyclindromatosis tumor suppressor, ubiquitin-specific proteases 7, 11, 15 and 20, A-20 and signal-transducing adaptor molecule binding protein-like-1 in order to improve the cellular signaling pathways. The viral oncoproteins binding to DUB, leading to proliferation of virus-infected cells and cell transformation. Proto-oncogenes (c-onc genes) are the cellular form of v-onc genes. The activation of c-onc genes leads to cell growth. C-onc genes are transformed into an oncogenic form by viral infection. C-onc genes play some roles such as protein kinases, growth factors, growth factor receptors, and DNA binding proteins. The study of transforming retroviruses and their oncogenes and the multiple mechanisms deployed by other RNA viruses to use the growth-suppressive and proapoptotic function of tumor suppressor genes has been added to our current understanding of cancer biology. Oncogenic RNA viruses are important experimental models to study molecular investigation such as cellular networks, including the discovery of oncogenes and tumor suppressors. Understanding of different strategies of RNA viruses as well as the function of their proteins helps to make more extensive plans regarding the adoption of follow-up, prevention and treatment strategies in cancer patients caused by viral origin.

Key words: RNA virus, cancer, oncogenesis, tumor, carcinogen, Iran.

РОЛЬ РНК-ВИРУСОВ В ОНКОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА

Фазлалипур М.^{1,2}, Моллаи Х.Р.³

¹ Сотрудничающий центр ВОЗ по стандартам и исследованиям бешенства, Институт Пастера Ирана, Тегеран, Иран

² Исследовательский центр новых и вновь возникающих инфекционных заболеваний, Институт Пастера Ирана, Тегеран, Иран

³ Керманский университет медицинских наук, г. Керман, Иран

Резюме. Известно, что многие РНК-вирусы являются онкогенными (или канцерогенными) при различных видах рака у животных и человека. Увеличение заболеваемости и распространенности вирусов, вызывающих рак, в человеческой популяции можно расценивать как ключевой предшественник развития различных видов рака. Семейство ретровирусов и вирус гепатита С (ВГС) также вызывают рак. Вирусные онкопротеины, такие как Так Т-лимфотропного вируса человека (HTLV-1), взаимодействуют с клеточным комплексом убиквитинирования, таким как супрессор опухоли цилиндроматоза, убиквитин-специфические протеазы 7, 11, 15 и 20, А-20 и STAMBP1 для усиления клеточных сигнальных путей. Вирусные онкопротеины связываются с деубиквитиназой, что приводит к пролиферации инфицированных клеток и клеточной трансформации. Протоонкогены (гены с-онс) представляют собой клеточную форму генов v-онс. Активация генов с-онс при-

Адрес для переписки:

Мехди Фазлалипур
Тел.: 00989126222938.
E-mail: mfp.virology@gmail.com

Contacts:

Mehdi Fazlalipour
Phone: 00989126222938.
E-mail: mfp.virology@gmail.com

Для цитирования:

Фазлалипур М., Моллаи Х.Р. Роль РНК-вирусов в онкогенезе человека // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 209–226. doi: 10.15789/2220-7619-TRO-17585

Citation:

Fazlalipour M., Mollaei H.R. The role of RNA viruses in human cancers // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 209–226. doi: 10.15789/2220-7619-TRO-17585

© Fazlalipour M., Mollaei H.R., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TRO-17585>

водит к росту клеток. Гены *c-onc* трансформируются в онкогенную форму при вирусной инфекции могут выступать в качестве протеинкиназ, факторов роста, рецепторов факторов роста и ДНК-связывающих белков. Изучение трансформирующих ретровирусов и их онкогенов, а также разных механизмов, используемых другими РНК-вирусами для подавления роста и проапоптотической функции генов-супрессоров опухолей приносит новые данные в понимание биологии рака. Онкогенные РНК-вирусы являются важными экспериментальными молекулярными моделями по изучению клеточных сетей, включая открытие онкогенов и супрессоров опухолей. Понимание различных стратегий РНК-вирусов, а также функций их белков помогает расширить стратегии для последующего наблюдения, профилактики и лечения больных раком, обусловленного различными вирусами.

Ключевые слова: РНК-вирус, рак, онкогенез, опухоль, канцероген, Иран.

Introduction

Cancer is a main disease affecting individuals and health care systems. Generally, carcinogenesis plays a complex, multistep process, and it has been represented that several viruses play significant roles in different stages and development of human neoplasm. The association of a virus with cancer has been proved and the study of oncogenic viruses is important to the discovery of cellular pathways.

M'Fadyan and Hobday described the cell-free transmission of oral dog warts in 1898, and in 1907 Ciuffo published similar transmission studies with human warts [76, 133]. In 1908, Ellermann and Bang showed that leukemia in birds could be transmitted from animal to animal via leukemic cells or serum [87]. Peyton Rous in 1911 produced solid tumors in chickens using cell free extracts from a transplantable sarcoma [9]. In 1966, Rous was awarded the Nobel Prize for his pioneering work over two decades on animal oncogenic viruses [28]. The cancer virology studies began one hundred years ago with the discovery of avian sarcoma and acute leukemia viruses. In 1970, the discovery of reverse transcriptase in retroviruses also accelerated research on these viruses [120].

After the successes of the animal tumor virus field, search for human tumor viruses became important. In 1964, the discovery of Epstein–Barr virus (EBV) from Burkitt's lymphoma (BL) and in 1970, the discovery of hepatitis B virus (HBV) in human sera, proved the roles of viruses in human cancer. Additionally, a broad epidemiological study provided a link between persistent HBV infection and liver carcinogenesis [5, 34, 113].

In 1984, human papillomavirus (HPV) 16 and 18 were isolated from human cervical cancer [18].

The third major discovery was the isolation of the human T-cell leukemia virus (HTLV-I) from T-cell lymphoma/leukemia patients, hepatitis C virus (HCV) and human herpes virus 8 (HHV8)/Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV).

General aspects of viral carcinogenesis

The nature of oncogenic viruses sets them apart from other carcinogenic agents and this understand-

ing has increased our knowledge of cellular pathways involved in growth and differentiation and neoplasia. Human oncogenic viruses belong to different virus families and an important feature of them is their ability to infect, but not kill, their host cell. These viruses have evolved strategies for evading the host's immune response.

These viruses contribute to carcinogenesis but the majority of tumor virus-infected patients do not develop cancer, and in those the development of cancer prolongs many years, passing between initial infection and tumor appearance.

The co-factors, such as host immunity and chronic inflammation and host cellular mutations play an important role in the transformation process.

The geographical distribution of many virus-associated cancers and geographical restriction of the virus or access to essential co-factors, have proved the role of viruses in cancer. Thus, the contribution of virus-mediated tumorigenesis to molecular events in cells and long-term interactions between virus and host are features of viral oncogenesis [8].

Human oncogenic viruses

Human tumor viruses belong to a number of virus families, including the RNA virus families such as *Retroviridae* and *Flaviviridae* and the DNA virus families such as *Hepadnaviridae*, *Herpesviridae*, and *Papillomaviridae*. Viruses that are compellingly associated with human malignancies include; (1) HTLV-1 (adult T-cell leukemia (ATL)), (2) HPV (cervical cancer, skin cancer in patients with epidermodysplasia verruciformis (EV), head and neck cancers, and other anogenital cancers) (3) HHV-8 (Kaposi's sarcoma (KS), primary effusion lymphoma, and Castleman's disease) (4) EBV (Burkitt's Lymphoma (BL), nasopharyngeal carcinoma (NPC), post-transplant lymphomas, Hodgkin's disease and (5) HBV and HCV (hepatocellular carcinoma (HCC)) [34].

Viruses with potential roles in human malignancies include; (1) simian vacuolating virus 40 (SV40) (brain cancer, bone cancer, and mesothelioma); (2) BK virus (BKV) (prostate cancer) (3) JC virus (JCV) (brain cancer) (4) human endogenous retroviruses (HERVs) (germ cell tumors, breast cancer, ovarian-cancer, and melanoma) (5) human mammary tumor

virus (HMTV) (breast cancer) and (6) Torque teno virus (TTV) (gastrointestinal cancer, lung cancer, breast cancer, and myeloma). Studies of RNA tumor viruses have led to the discovery of oncogenes, tumor suppressors and our understanding of the etiology of carcinogenesis, both virally and non-virally induced [50, 64].

Ubiquitination

Ubiquitin is a 76-amino acid polypeptide encoded by at least four different genes in mammalian cells; UBA52, UBB, UBC and RPS27a. The UBB and UBC genes code for poly-ubiquitin precursors, but the UBA52 and RPS27A genes encode fusion proteins L40 and S27a, respectively. These precursor proteins are processed by the cellular endopeptidases [48].

Ubiquitination has different effects on cellular processes such as protein turnover, transcription, cell cycle progression, host defense, signal transduction pathways, receptor recycling, endocytosis, chromatin remodeling, angiogenesis, apoptosis, nuclear export of mRNA, DNA repair and also ubiquitination of proteins could affect their stability, conformation, intracellular localization, protein-protein interaction.

E1 is a universal ubiquitin activating enzyme, E2 is an ubiquitin conjugating enzyme and E3 is an ubiquitin ligase. The E4 ubiquitin ligase acts in association with the E3 ubiquitin ligase.

Ubiquitination involves monoubiquitin or poly-ubiquitin chains on single or multiple lysine residues in which ubiquitination at Lysine 11 (K-11), Lysine 48 (K-48) and lysine 63 (K-63) are the most studied ubiquitination.

The K-11 and K-48 are involved in the degradation of proteins and the K-63 regulates the intracellular localization and their activity [86].

The process of ubiquitination can be corrupted by proteases called deubiquitinases or DUBs. The human genome encodes for at least 98 known DUBs which have been classified into 6 different families (1) ubiquitin-specific proteases (USPs), (2) ubiquitin carboxyterminal hydrolases (UCHs), (3) ovarian-tumor proteases (OTUs), (4) Machado–Joseph disease protein domain proteases (MJD), (5) Jab1/Mov34/Mpr1 (JAMM) metalloprotease deubiquitinase and (6) monocyte chemotactic protein-induced protein (MCPIP) family [82, 115].

These proteases play a key role in maintenance of the free ubiquitin pool, histone modification, protein stability, vesicular trafficking, and receptor recycling. DUBs can modulate cell signaling, DNA damage repair, cell cycle progression, immune responses and apoptosis. Mutations or altered expression levels of DUBs in signaling pathways, Chromatin remodeling, immune response, angiogenesis, cell cycle progression, apoptosis and stress response cause the development of cancers and disorders in humans [24].

DUBs are reported to play an important role in the life cycle of many human oncogenic viruses. These viruses not only engage cellular DUBs but encode their own DUBs to support virus invasion, replication, and persistence or to destroy host immune responses [103].

Many USPs are reported to play a role in carcinogenesis. Some OTUs are regulated in tumorigenesis and constitute a 15 member strong family of proteases in humans. Apart from the ovarian tumor domain, the members also have UIMs, UAD and Zn fingers. The MCPIP family of DUBs has seven members which are reported to play a role in cancer-related pathways. USP6 was the first DUB to be identified as an oncoprotein that has function as both, an oncoprotein or a tumor suppressor and can also interact with a viral oncoprotein to drive oncogenesis. Interestingly, viral DUBs have also been implicated as mediators of oncogenesis [103] (Fig. 1).

Growth factors

Growth factors are polypeptides that stimulate the proliferation in target cells caring receptors to be able to respond to growth factors. For example, platelet-derived growth factor (PDGF), composed of 2 polypeptide chains, induces the proliferation of fibroblasts [62].

The relation between growth factors and retroviral oncogenes was clarified by *sis* oncogene studies on the simian sarcoma virus, which was the first retrovirus isolated from monkey fibrosarcoma [125].

The *sis* gene encodes the PDGFs beta chain and showed that growth factors that are inappropriately expressed have functions similar to oncogenes. Studies revealed that expression of the *sis* gene product (PDGF- β) leads to significant neoplastic transformation in fibroblasts, but this transformation was not in cells without the PDGF receptor. Therefore, *sis* transformation needs interaction between the *sis* gene product and the PDGF receptor [72].

Growth factor receptors such as *erb B*, *erb B-2*, *fms*, *kit*, *met*, *ret*, *ros*, and *trk* have protein structure with 3 parts: the extracellular ligand-binding area, the transmembrane, and the intracellular tyrosine kinase catalytic ones. These receptors can enable one-way passage of information from the cell membrane. The mutation and abnormal expression in growth factor receptors cause transformation into oncogenes [106].

Mitogenic signals are transmitted from growth factor receptors to the cell nucleus by signal transduction. Signal transducers are composed of 2 main groups: nonreceptor protein kinases and guanosine triphosphate (GTP)-binding proteins. The nonreceptor protein kinases are divided into subgroups: tyrosine kinases (*abl*, *lck*, and *src*) and serine/threonine kinases (*raf-1*, *mos*, and *pim-1*). GTP-binding proteins with GTPase activity are divided into monomeric (H-ras, K-ras, and N-ras) and heterotrimeric

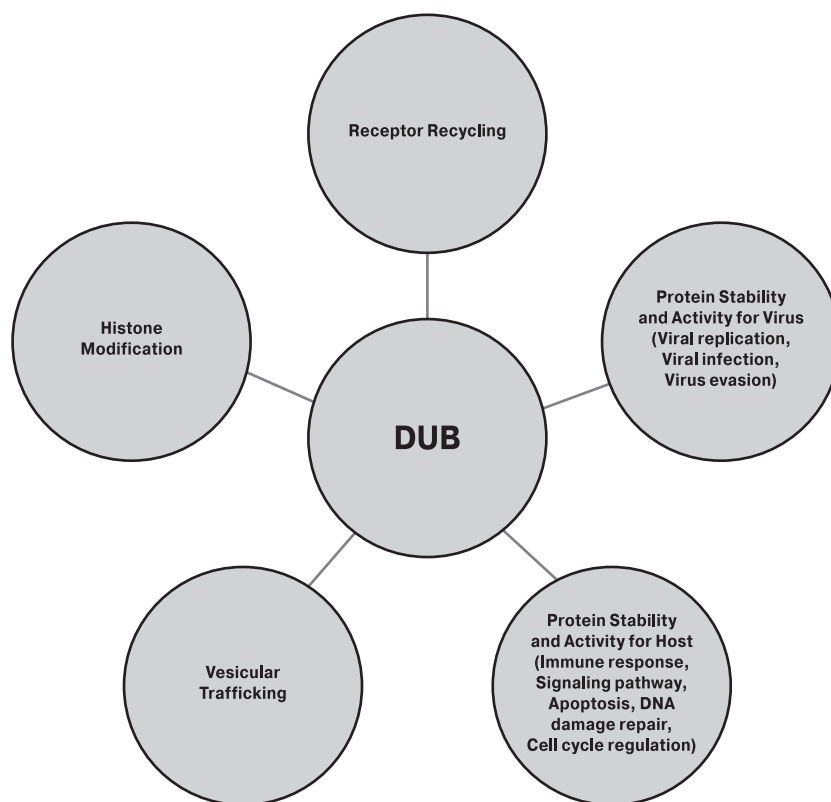


Figure 1. Multiple roles of DUBs in Viral and Host systems

(gsp and gip) groups. Signal transducers are transformed into oncogenes by mutations that lead to activities, frequently causing uncontrollable cellular proliferation [121].

Transcription factors

Transcription factors are nuclear proteins and their regulation is induced by binding to specific DNA sequences located above the target genes or heterodimeric complex proteins.

Transcription factors can modulate extracellular signals into modulated changes in gene expression. Many c-onc genes are transcription factors and have homology with protooncogenes. Some examples of these factors are erb A, ets, fos, jun, myb, and c-myc. C-onc genes as a transcription factors are activated with chromosomal translocations in hematologic and solid neoplasms [106].

Uncontrollable cell proliferation has been shown in cancer cells and programmed cell death leads to neoplasia and failure in anticancer treatments. In chromosomal translocations in human lymphoma, Bcl-2, was discovered and shown as a protooncogene that regulates programmed cell death [23].

Tumor suppressor genes

Tumor suppressor genes function in the prevention and regulation of cell growth. When these genes lose their alleles, they fail to regulate and prevent

cell growth. Mutations can be passed on to the next generation and individuals with mutations malignancy development. The retinoblastoma gene (Rb) and p53 are the most studied tumor suppressor genes [126].

Other tumor suppressor genes are the VHL gene in Von Hippel–Lindau syndrome, Wilms tumor gene (WT1), NF1 and NF2 genes in neurofibromatosis, and APC and DCC genes in familial adenomatous polyposis [30, 66, 84].

Oncogenesis

Viruses encourage hematopoietic tumors, sarcomas and carcinomas. Oncogenesis is a cytological, genetic, and cellular transformation process that results in malignant tumors. The discovery of viral oncogenes are derived from cellular genes called protooncogenes led to the understanding the roles of c-onc genes in different tumor types. The activation of oncogenes requires genetic changes in cellular protooncogenes. Oncogenes are activated by mutation, gene amplification and chromosome rearrangements [65, 77].

Expression of the neoplastic phenotype includes the capacity for metastasis and usually requires a combination of protooncogene activation and tumor suppressor gene loss or inactivation.

The roles of c-onc genes in tumor formation were strengthened with studies of oncogenic retroviruses without v-onc genes, which integrate near the c-onc

genes and activate their expression. The c-myc gene has been detected in some avian retroviruses (MC29, OK-10, and MH2). It is activated via insertional mutagenesis in lymphomas stimulated by avian leukosis virus (ALV), Moloney murine leukemia virus (Mo-MLV), and various other viruses that do not carry v-onc genes [81, 106].

Direct stimulation of growth

In viral entry, the surface (SU) proteins can bind to growth factor receptors on the cell surface and stimulate growth signals by imitating normal ligand receptor interaction. These interactions arouse viral replication by the interaction of SU protein with a surface receptor that induces growth and makes cells susceptible to infection. This growth can also increase the number of appropriate target cells and the number of infected cells increases the amount of viral replication.

Erythroleukemia, caused by a polycythemic strain of the Friend virus, can set an example for tumor induction resulting from stimulation of growth receptors by Env proteins. This virus diffuses erythroid proliferation, which causes splenomegaly [106].

RNA tumor viruses

Although the Retroviridae family has been associated with many animal tumors, only one human retrovirus, HTLV-1, has been related to human cancers. Studies with animal retroviruses can be helpful in establishing the concept of oncogenic viruses and the discovery of oncogenesis, and also may give more information about tumor suppressors and regulators of cellular signal transduction pathways [63].

The development of an *in vitro* transformation assay for Rous sarcoma virus (RSV) helped us with the genetic analysis of the retroviral life cycle and retrovirus-induced transformation in cell culture [116]. After infection, the viral RNA genome is reverse-transcribed by the viral reverse transcriptase into a double-stranded DNA. Then it integrates into the host chromosome and is expressed under the control of viral transcriptional regulatory factors [107].

As a result of integration, retroviruses acquire and transduce cellular genetic material to activate or inactivate cellular genes via provirus insertion [125]. The transducing retroviruses that led to RSV transforming gene, v-src, hybridized into cellular sequences; ultimately [125]. The transducing retroviruses, that led to RSV transforming gene, v-src, hybridized to cellular sequences; ultimately this finding led to the discovery of proto-oncogenes, a group of cellular genes that mediate viral carcinogenesis and have important roles in the control of cell growth and differentiation [75]. The viral oncogenes (v-onc genes) can alter host cell proliferation control, leading. The viral oncogenes (v-onc genes) can alters

host cell proliferation control, leads to the synthesis of new proteins, and are responsible for transformation characteristics. Protooncogenes (c-onc genes) can be classified into different groups in terms of their protein products, such as protein kinases, growth factors, growth factor receptors, and DNA binding proteins. There are also genes that prevent malignant transformation, which are the cellular equivalents of v-onc genes. The activation of c-onc genes with mutation leads to uncontrolled cell growth [7].

C-onc genes are transformed into an oncogenic form by point mutation, amplification, deletion, or chromosomal translocation. They are called antioncogenes (tumor suppressor genes) and unpreventable growth occurs when these genes lose their suppressive effects. Oncogenes are firmly struggling with tumor suppressor genes, which protect DNA and control cell activities [7].

Three basic genes (gag, pol, and env) of Retroviruses are used for the synthesis of structural proteins, virion-associated enzymes, and envelope glycoproteins [59]. Lentiviruses have an extra nonstructural gene (v-onc) that transforms host cells. In 1961, it was found that Rous sarcoma virus (RSV) contains RNA and then the fourth gene in the RSV, v-scr (sarcoma) gene, was discovered [117].

Some RNA tumor viruses can encode oncogenic proteins (like cellular proteins involved in cellular growth control) that cause tumor development.

The second group of retroviruses can cause cell transformation by integration of their promoters and viral enhancers near the cellular growth-stimulating gene.

The third group encodes a protein tax that transactivates the expression of cellular genes [106].

Some retroviruses, called exogenous, show a horizontal spread and their genes only exist in infected cells, whereas endogenous retrovirus gene sequences are localized to the chromosomes of all cells.

Most exogenous retroviruses are oncogenic and some of them can lead to the development of lymphoma, leukemia and carcinoma.

Retroviruses are divided into acute transforming retroviruses which can rapidly cause tumors within days after injection. These retroviruses also transform cell cultures into neoplastic phenotypes. Chronic transforming retroviruses can cause tumors in experimental animals after a period of many months [32].

Numerous animal retroviruses with oncogenic properties have been discovered. Related to Scr, the transduced retroviral oncogenesis is derived from cellular sequences and is not necessary for viral replication. The recombination events that allow obtaining of host cell derived coding sequences often leave viral genomes mutated and the virus defective for replication. These viruses are dependent on replication helper viruses to provide the replication factors [71].

Cellular transcriptional and translation are lost and the over-expression of a proto-oncogene under the control of viral promoters can cause malignant transformation.

The acquired proto-oncogene is not necessary for viral replication but is replicated as the viral genome, acquiring frequent mutations in infected cells. Such oncogene transducing retroviruses efficiently transform cells and cause tumors in experimental animals. Mutations in cellular oncogenes that arise in human tumors as a consequence of mutagenesis are discovered in transducing carcinogenic retroviruses [101].

Human RNA viruses that cause cancer include the retrovirus Human T-cell Leukemia virus type I (HTLV-I) and hepatitis C virus (HCV) [80].

Other RNA viruses

The cis-acting retroviruses do not contain host cell derived sequences but transform cells by integrating a near cellular proto-oncogene or tumor suppressor and retain all of their viral genes and so replicate without helper virus [17].

These viruses cause malignancy in some infected animals after a longer latency period, and they generally do not efficiently transform cells in culture.

Moreover, the Friend murine leukemia virus had integrated into both alleles of the p53 gene in an erythroleukemic cell line, providing evidence that p53 was a tumor suppressor rather than an oncogene. Friend murine leukemia virus (F-MuLV) can cause leukemogenesis consisting of an acute transforming virus spleen focus-forming virus (SFFV) as well as a helper virus (F-MuLV). Friend SFFV oncogene is a deleted version of a retroviral envelope protein that is a recombinant between F-MuLV and an endogenous MuLV-related provirus [90].

The SFFV env protein activates signal transduction pathways. The Friend virus complex has a role in insertional oncogenesis, including inactivation of the

p53 tumor suppressor gene. Proto-oncogenes activation and mammary carcinogenesis induced by Mouse mammary tumor virus (MMTV) infection in the immune system (dendritic cells, T and B lymphocytes) before trafficking to the mammary gland [31, 98].

MMTV also encodes additional proteins (besides the standard retroviral Gag, Pol and Env proteins), including a viral super antigen (Sag) and a small regulatory protein Rem that are both important for replication *in vivo* [14]. Jaagsiekte sheep retrovirus JSRV (like MMTV) is a beta retrovirus, and it induces lung cancer in sheep [49]. While JSRV does not carry cellular proto-oncogene, the envelope protein of this virus also functions as an oncogene. The JSRV Env protein induces oncogenic transformation [55].

Like MMTV, JSRV also encodes a small regulatory protein Rej that is necessary for unspliced viral RNA translation. Epsilonretroviruses, in particular walleye dermal sarcoma virus (WDSV) causes dermal sarcomas in walleye pike. WDSV encodes viral cyclin which has functions as both a repressor of viral transcription and an oncogene [13]. Delta retroviruses and HTLV-I encode a series of proteins derived by alternate splicing into the X region of the genome [1] (Table 1).

Nontransforming retroviruses activate cellular protooncogenes

Many retroviruses do not have viral oncogenes, like ALV and mouse mammary tumor viruses. They encourage tumor formation by integrating a provirus into normal cellular protooncogenes and inducing their expression through insertional mutagenesis by addition of the provirus presenting strong promoter and enhancer sequences in the gene locus [106]. More than 70 proto-oncogenes have been determined that are activated by proviral insertion of a non-transforming retrovirus [32]. The replication of these viruses without oncogenes does not transform cells in culture and make tumors *in vivo* with long latent periods. Most of the infected cells proliferate, and changes in the cell and infected tissue morphology are significant. A widespread viral replication is seen in the latent period or preleukemic stage of the disease. In infected cells with ALV, malignant disease is significant in the bursa [99]. During lymphoma development in mice, proliferative changes have been determined in the thymus. Proliferative changes and preleukemic cells can be clearly detected in the bone marrow and spleen before thymic lymphoma develops. Avian leukosis virus with c-myc and mouse mammary tumor virus with fibroblast growth factor Int-2 or Wnt-1 do proviral insertional mutagenesis [32]. In rodent, feline, and avian retroviruses, such as avian leukosis virus and mouse mammary tumor virus (MMTV), insertional mutagenesis is observed [10]. There is no evidence to show this mechanism significantly contributes to human carcinogenesis, cloning of affected genes

Table 1. The animal oncogenic RNA viruses

Taxonomic grouping	Examples	Tumor Types
Alpharetrovirus	AEV	Erythroblastosis, Carcinoma, Sarcoma
	ALV	
	ASV	
Deltaretrovirus	BLV	Lymphoma
Gammaretrovirus	Ab-MLV	Lymphoma
	FeLV	
	FeSV	
	Mo-MLV	
	MSV	

Note. AEV: Avian erythroblastosis virus, ALV: Avian leukosis virus, ASV: Avian sarcoma virus, BLV: Bovine leukemia virus, Ab-MLV: Abelson murine leukemia virus, FeLV: Feline leukemia virus, FeSV: Feline sarcoma virus, Mo-MLV: Moloney murine leukemia virus, MSV: Murine sarcoma virus

led to the discovery of numerous oncogenes, such as *int-1*, *int-2*, *Pim-1*, *bmi-1*, *Tpl-1*, and *Tpl-2*, that contribute to the development of human neoplasms [76].

Role of the long terminal repeat in oncogenesis

Long terminal repeat (LTR) sequences have effects on the types of tumors and found one of the main factors for distinguishing oncogenic and nononcogenic murine leukemia viruses (MLVs) and ALVs. Simple retrovirus expression is controlled by LTR. LTR has a U3 region, which contains promoter and enhancer attachment motifs that restrain the expression of sequences placed under their control. These factors affect the virus replication cycle. High levels of replication increase recombinant oncogenic potential [58].

The influence of the viral long terminal repeats (LTRs) on the proto-oncogenes LTR is activation of proto-oncogenes. Some changes in the 5'-LTR, such as deletions or hypermethylation, are common in Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL or ATLL) cells. As a result, the transcription of viral genes encoded on the plus strand is blocked but the 3'-LTR is conserved and hypomethylated in all ATLLs [83, 119] (Table 2).

Human T-cell leukemia virus (HTLV-1)

In 1977, HTLV-1 was discovered as the first human oncogenic retrovirus by Takatsuki and colleagues who studied a particular leukemia termed adult T-cell leukemia (ATL) in Japan [38].

In 1980, Robert Gallo identified a novel retrovirus in cultured human T-cell lymphoma cells, which was named the human T-cell lymphotropic virus (HTLV-1) [20].

HTLV-1 is a single-stranded RNA retrovirus with a diploid genome which is a delta type complex retrovirus and is the agent of ATL and tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). Approximately 10% of infected patients are thought to develop cancer, primarily adult T-cell leukemia (ATL) [78, 79, 127].

It is estimated that about 20 million people worldwide are infected with HTLV-1 and it is endemic to Japan, South America, Africa, and the Caribbean [4]. HTLV-1 does not have a classical oncogene, but the virus can cause expression of cellular protooncogenes. In non-endemic regions like the USA, England, and in the Caribbean Islands, parts of South America and Africa, the virus is also associated with ATL as well as some T-cell lymphomas and forms of mycosis fungoides [42].

The virus is transmitted from mother to child via breast milk or transplacentally. All ways such sexual and intravenous transmission happen by infected T cells, not free virus, which probably is due to its low levels of transmission to contacts [96].

Table 2. Human oncogenic RNA viruses

Taxonomic grouping	Examples	Tumor types
Retroviridae	HTLV type 1	Adult T cell leukemia
Flaviviridae	Hepatitis C virus	Hepatocellular carcinoma

Note. HTLV: Human T-cell leukemia virus.

People who are at low risk of blood-borne infections tend to show HTLV-1 infection rates below 1%, while those at high risk (such as injection users) can have much higher rates [60].

A second retrovirus, HTLV-2, was isolated from a case of hairy-cell leukemia, but the virus has remained an agent without an established disease association [74].

The HTLV-1 itself, in contrast to HIV, is genetically stable because the HTLV-1 proviral genomes are replicated in their host by cellular polymerase not by reverse transcriptase, which is error-prone, and is used for replication of virus. There is no vaccine available for this virus and treatment is restricted to management of the opportunistic infections resulting from the immunosuppression caused by ATL [85].

Oncogenic properties and mechanism of oncogenesis

HTLV-1 can transform CD4 and CD8 positive T cells. HTLV-1 also infects B and T lymphocytes, dendritic cells, fibroblasts and rodent cells. 1–5 percent of mononuclear cells integrate proviral DNA in peripheral blood in asymptomatic carriers. The viral genome persists as a DNA copy or proviral genome in CD4⁺ T cells [43, 57].

After infection, the viral reverse Transcriptase (RT) using viral RNA as, template, synthesizes proviral DNA that is integrated into the host cell genome by virally encoded integrase. Viral replication is directed from these integrated viral genomes. The U3 region of the 5'-LTR serves as the viral promoter and is instrumental in determining whether an infected cell is permissive for viral replication [73].

Typical retroviral genes (*gag*, *pro*, *pol*, *env* and *IN*) are encoded by the genome, but there are six proteins encoded within the *px* region of the genome. HTLV-1 proviral DNA integrates into chromosomal sites in all ATL cells in patients producing a state of "clonal integration" [21, 46].

Unlike many other retroviruses, but like bovine leukemia virus, HTLV-1 does not have an oncogene derived from a cellular protooncogene [29].

The viral accessory protein Tax, is the major transforming protein of HTLV-1 which modulates expression of viral genes like long terminal repeats (LTRs), and also dysregulates multiple cellular transcriptional signaling pathways including nuclear factor kappa B (NF- κ B), serum responsive factor

(SRF), cyclic AMP response element-binding protein (CREB), and activator protein 1 (AP-1) [29, 52].

Tax binds directly to promoter or enhancer sequences and also interacts with cellular transcriptional co-activators such as p300/CBP, and P/CAF. In addition, Tax is also able to inactivate p53, p16INK4A, and the mitotic checkpoint protein, mitotic arrest deficient (MAD) 1 [109]. Moreover, the C-terminal PDZ domain-binding motif of Tax interacts with the tumor suppressor hDLG, which is important for transformation of rat fibroblasts and inducing interleukin-2 independent growth of mouse T-cells [19].

Tax proteins are found in only 40% of ATLs, suggesting that Tax may be necessary to initiate transformation, but may not be needed for maintenance of the transformed phenotype. Tax is the main aim of the host's cytotoxic T lymphocyte (CTL) response; therefore, the reduction of Tax expression allows infected cells to evade immune surveillance and allows for progression of ATL [130].

There are several mechanisms by which ATL cells lose Tax expression, such as the loss of the viral promoter for tax transcription, the 5'-LTR, mutation of the tax gene, and epigenetic changes in the 5'-LTR [83].

It has been shown that HTLV-1 Tax expression causes multipolar mitoses, from which aneuploidy can arise. So Tax targets the cellular TAX-1 BP2 protein, which normally hinders centriole replication, thus, making numerical centrosome aberrations. Tax engages RAN-BP1 during mitosis and fragments spindle poles, thereby provoking multipolar, asymmetrical chromosome segregation. Such mechanisms help the long-standing observations of aneuploidy and multipolar spindles in ATL cells ("flower cells") [91].

In addition, it has been demonstrated in ATL cell lines to lack an intact mitotic spindle assembly checkpoint, which may be associated with binding to MAD1. Tax may act as a mitotic mutator gene, increasing the incidence of mitotic abnormalities by binding and activating the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C), thereby promotes premature securin reduction and mitotic exit, thus leading to aneuploidy [76].

Tax (trans-acting factor) encoded by the px region is necessary for cellular transformation and interacts with specific sets of cellular genes.

Tax activates the IL-2 receptor and several cytokines involved in T-cell growth by destabilizing I- κ B and activating NF- κ B. Tax also blocks cellular gene expression through CREB/CRE. Tax can induce Bcl-XL and resistance to apoptosis. Tax interferes with the DNA polymerase and DNA repair mechanisms and inactivates p16 INK4A, an inhibitor of cyclin-dependent kinases 4–6. Tax can miss the mitotic checkpoint by causing mislocation of hsMAD1 and hsMAD2 [40].

In all ATL cells, the HBZ mRNA is transcribed from the 3'-LTR. Suppression of HBZ gene transcription inhibits the proliferation of ATL cells. HBZ gene expression induces the proliferation of a human T-cell line. HBZ may have a function at the mRNA and protein levels, as the RNA form of HBZ supports T-cell proliferation through regulation of the E2F1 pathway, whereas HBZ protein suppresses Tax-mediated viral transcription through the 5'-LTR [102, 112].

HTLV-1 and STAMBPL1

The Tax oncoprotein of HTLV-1 is known to shuttle across nuclear-cytoplasmic compartments and Tax activates the host NF- κ B pathway and engages the host transcriptional machinery to drive viral gene expression [36].

The K-63 ubiquitinated Tax (by UbC13) interacts with I κ KK γ to activate the I κ K. Signal transducing adaptor molecule binding protein-like 1 (STAMBPL1) is a DUB from the JAMM metalloprotease deubiquitinase family which acts as a partner to Tax [103].

STAMBPL1 acts on the K-63 linked ubiquitin and plays a role in cell surface receptor recycling. In ATL cases, STAMBPL1 cooperates with Tax and leads its translocation from the nucleus to the cytoplasm. This move defends Tax from its K-48 linked ubiquitination and proteasomal degradation inside the nucleus. Thus, STAMBPL1 protection for Tax and its movement to the cytoplasm is responsible for the activation of I κ K and NF- κ B by Tax and potentiating of T-cell transformation by HTLV-1 [22].

HTLV-1 and CYLD

The active CYLD is able to K-63 deubiquitinating Tax oncoprotein in the nucleus. This deubiquitinated Tax is unable to activate I κ K but not Tak1 (an activator of I κ K- β). So, I κ B α and NF- κ B inhibitors are stabilized. The HTLV-1 transforms T-cells constitutively phosphorylate CYLD to make it catalytically compromised. Thus, the virus overcomes the CYLD-mediated NF- κ B in activation, which is helpful for the proliferation of virus infected host cell [22, 45].

HTLV-1 and USP20

The cellular USP20 is able to subvert the activity of Tax oncoprotein. USP20 can deubiquitinate TRAF-6 and inactivate it or can deubiquitinate the K-63 polyubiquitinated Tax to prevent its association with I κ K- γ for its activation. So USP20 can be detrimental to the NF- κ B signaling stimulated propagation of HTLV infected cells. This strategy causes unchecked proliferation and transformation of the HTLV-infected cells [22, 45] (Fig. 2).

Human immunodeficiency virus (HIV)

The human immunodeficiency virus (HIV) is a Lentivirus of the Retroviridae family, as an enveloped RNA virus that includes some of the most influential viruses on in human populations, such as leukemia viruses. In fact, the Human Immunodeficiency Virus (HIV) causes worldwide Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) pandemic and is behind the millions of deaths the worldwide and suffering [16].

The viral genome is a dimer of linear RNA with each strand being 7 to 15 kilobases in length. There are generally three large genes, which are gag, for group specific antigen (structural proteins); pol, for polymerase (variety of enzymes); and env, for envelope proteins [37].

HIV is transmitted by unprotected sex, injections with needles used by an HIV-infected person, pre-natal or perinatal exposure of infants from infected mothers, transfusion of blood products containing HIV, organ transplants from an infected person and needle sticks from health care workers [105].

HIV enters the host cell via the CD4 molecule and chemokine receptor as receptors. HIV infects human immune system cells such as helper T cells (specifically CD4⁺ T cells), macrophages, and dendritic cells [41]. HIV causes low levels of CD4⁺ T cells through a number of mechanisms, including apoptosis of uninfected bystander cells, direct killing of infected cells by viruses and killing of CD4⁺ T cells by CD8 cytotoxic lymphocytes. When the CD4⁺ T cell drops below a critical level, the body becomes more susceptible to opportunistic infections [124].

Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) caused by HIV, does not lead to cancers directly, but the infection can increase a person's risk of getting several types of cancer.

As a matter of fact, the immune system destroys cancer cells, so a weak immune system lets cancer cells survive to grow into a tumor.

HIV infection may be linked to Kaposi sarcoma and cervical cancer. It's also related to non-Hodgkin lymphoma, lymphoma, and central nervous system lymphoma [108].

Anal cancer, lung cancer, cancers of the mouth and throat, Hodgkin lymphoma, skin cancers (basal cell, squamous cell, and Merkel cell) and liver cancer are other types of cancer that may be more likely to develop in people with HIV infection [44].

Many people infected with HIV are also infected with other viruses that cause certain cancers. HIV infection causes weakness in the immune system and reduces the body's ability to fight infections that may cause cancer.

The highly active antiretroviral therapy (HAART) greatly reduced the incidence of Kaposi sarcoma and non-Hodgkin lymphoma among people infected with HIV. HAART reduces the amount of HIV in the blood and restores immune system function.

Although, the risk of these cancers is still much higher among people infected with HIV. This high risk may be due However, to the fact that immune system function remains substantially impaired in people treated with HAART. In addition, over time, HIV can develop resistance to the drugs used in HAART [26].

Human endogenous retroviruses (HERVs)

HERVs are sequences that resemble infectious retroviruses that result from exogenous retroviral infections that have become incorporated into the germ line DNA. HERVs comprise 8% of the genome and have a similar genomic organization to exogenous complex retroviruses such as Human Immunodeficiency virus (HIV) and HTLV [39].

Recent evidence suggests that some HERVs may have both physiological and pathological roles in human malignancy. Some HERVs have a role in human malignancy, due to the increased expression of the HERV mRNA functional protein and retrovirus-like particles in certain cancers.

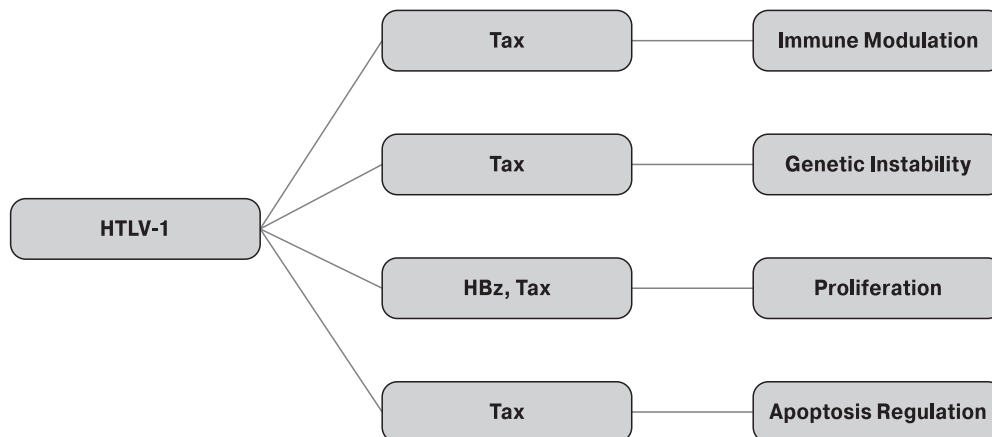


Figure 2. Schematic depiction of the major biological activities that contribute to the transforming activities of HTLV-1

HERVs may be associated with the generation of new promoters or the activation of protooncogenes [25].

The association of HERV-K with cancers, breast cancer, including germ cell tumors, myeloproliferative disease, ovarian cancer, melanoma and prostate cancer has been proved. The HERV-K proteins Rec and Np9 can bind the promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein and suggest that HERV-encoded proteins may cause carcinogenic process [111].

The recurrent chromosomal translocations contribute to the development of human solid tumors and these translocations result in HERV-K regulatory sequences being placed upstream of the coding sequences of ETS transcription factor family members. These translocations are similar to insertional mutagenesis, where retroviruses contribute to carcinogenesis by integrating in the cellular protooncogenes and causing their aberrant expression [101].

Mouse and Human mammary tumour virus (HMTV)

Mouse mammary tumor virus (MMTV) is a retrovirus which belongs to the genus Betaretrovirus. Since 1943, the role of HMTV in human breast cancers has been determined, when a mouse mammary tumor virus (MMTV) was shown to cause mammary cancers in mice [98].

Several investigations established that MMTV-like sequences were present in human breast cancer, but not present in normal tissues. MMTV also encodes additional proteins (besides the standard retroviral gag, pol and env proteins), including a viral super antigen (Sag) and a small regulatory protein Rem that are both important for replication *in vivo* [31].

In mice, HMTV increases tumor formation through the insertion mutagenesis of Wnt oncogenes [2].

It has been reported that env is absent in normal tissues and present in breast cancer tissues in both mice and human samples. The common integration MMTV sites is in loci 35, which contains regions of the Fgf and Rspo genes. The Phf19 gene increases cell invasion and Fox1 promotes anchorage colony formation of infected cells [2].

Infected cells with MMTV have active Src kinase and escape from apoptosis by activation of tyrosine kinase-based activation motif-mediated Src tyrosine kinase signaling pathways [2].

In human breast tumors, approximately 20 common HMTV insertion sites are mutated for env, gag, and sag in patients with carcinoma and hyperplasia. 78% of MMTV genes are found in many human breast cancers. The presence of these viruses in breast cancer is associated with an increased grade of breast cancer [12].

A number of studies have suggested that an MMTV-related virus, human mammary tumor virus (HMTV), may be associated with human breast cancers.

A 660bp sequence similar to the MMTV env gene was detected in American women's breast cancers [12]. Moreover, integrated env and LTR HMTV genes of MMTV into several chromosomes stimulates oncogenesis via insertional mutagenesis.

The HMTV particles with morphogenic and molecular characteristics similar to MMTV were found in primary breast cancer cells (replicates successfully in human breast cancer cells) [128].

Xenotropic murine leukemia virus (XMRV)

In 1990, Xenotropic murine leukemia virus (XMRV) was discovered as a Gammaretrovirus (*Retroviridae* family) that arose from the recombination of two endogenous mouse retroviruses, and in 2006 an apparently novel retrovirus and potential human pathogen was introduced [93]. XMRV is a murine leukemia virus (MLV) that formed through the recombination of the genomes of two parent MLVs known as preXMRV-1 and preXMRV-2 [56].

In some studies on XMRV, the virus was detected in cancerous prostate tissues [104]. The data indicated the presence of a gammaretrovirus-like sequence in seven of eleven tumors homozygous for the R462Q mutation [123]. A 2009 study reported evidence of XMRV infection in 23% of subjects independent of the RNase L gene variation, and detection of XMRV was again reported in a 2010 article [88].

The causal role of XMRV in cancer and direct cell transforming has not been established. In prostate cancer, XMRV protein has been found in tumor-associated but nonmalignant stromal cells [110].

Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) was reported in patients with prostate cancer with a mutation in RNase L [94].

In familial prostate cancer, susceptibility locus Hpc1 is linked to mutations in the structural gene for RNase L which is a factor in the interferon induced innate viral response. The inherited defects in RNase L might cause infection with an oncogenic virus, thus causing the development of prostate cancer. XMRV protein was found in the hematopoietic and stromal cells of the prostate tumors [11].

Rous sarcoma virus (RSV)

Rous sarcoma virus (RSV) is an Alpharetrovirus, and it causes sarcoma in chickens. Harry Rubin and Howard Temin in 1958 reported that chicken embryo fibroblasts could be altered morphologically by RSV infection [100, 129]. It is known that the src gene is responsible for morphological transformation in healthy cells. Src is a tyrosine kinase which plays roles in the regulation of cell growth and differentiation. It has an SH2 and SH3 domain, which are responsible for its activation and deactivation [97].

The src gene is not necessary for RSV proliferation, but it increases virulence when present. The src

gene leads to uncontrolled growth in abnormal host cells. RSV takes up the src gene and incorporates it into its genome, conferring it with the advantage of being able to stimulate uncontrolled mitosis of host cells [51]. RSV has one glycoprotein, env, is made up of gp85 and gp37. The function of env is to bind RSV to the host cell receptor and induce fusion with the target cell. Gag proteins (Pr76) are necessary for virion assembly and mature virus infection of the host cell [51].

Hepatitis C virus (HCV)

HCV is a single-stranded RNA virus of the Hepacivirus genus in the *Flaviviridae* family [95]. More than one-third of liver cancers are linked to HCV infection in the United States and other countries, where both viral hepatitis and liver cancer are more common [27]. HCV is transferred from person to person through sharing needles, unprotected sex, or childbirth and this virus can also pass on through blood transfusions [3, 61]. The 9.6 kb genome has one open reading frame (ORF) and a 3000 amino acid residue polyprotein precursor cleaved by cellular and viral proteases into three structural proteins (core, E1, E2) and seven nonstructural proteins (p7, NS2, NS3, NS4a, NS4B, NS5A, and NS5B) [35, 89].

Persistent infection with HCV is associated with hepatitis, cirrhosis, hepatic steatosis, and hepatocellular carcinoma (HCC) [54]. In most infected patients, HCV prolongs a persistent and life-long infection via viral immune evasion strategies. The intermediated double-stranded RNA (dsRNA) during HCV genome replication stimulates cellular dsRNA-sensing machinery, which leads to the activation of proteins involved in antiviral response, including interferons (IFNs), interferon regulatory factors (IRFs), signal transducers and activators of transcription (STATs), interferon stimulated genes (ISGs) and NF- κ B [15].

From HCV proteins, NS5A and E2 mediated suppression of dsRNA-activated kinase PKR. HCV is also very effective in corrupting T-cell mediated adaptive immunity [92].

NS5A as a nonstructural protein has been implicated in conferring resistance to interferon and altering cellular signaling pathways [53]. Analysis of NS5a sequence from interferon resistant patients showed a sequence diversity that localized to a region of the NS5a gene. This region is called interferon sensitivity determining region (ISDR) [118].

This region was necessary for NS5a interaction with PKR (protein kinase, a mediator of apoptosis in response to certain types of cellular stress) induced by interferon that suppresses viral translation and interferon's antiviral effects [122].

The persistence of HCV infection causes quasi-species in which viruses escape the host immune system [33].

Quasi-species and persistent HCV infection are likely to be of the central importance to the development of HCC, whether transformation is induced by immune-mediated turnover of infected cells or caused by viral gene products.

HCV has used different mechanisms to cause persistent infections and evade the host immune response [70]. The generation of viral quasi-species resulted by error-prone replication, selects the virus to replicate in the presence of an immune response. Infection with HCV causes active inflammation and fibrosis, which can lead to cirrhosis and ultimately to tumor development [67].

Numerous co-factors such as coinfection with HBV and alcohol consumption are helpful for the development of HCC [131]. Viral Core, NS3, NS4B, and NS5A have been shown to be transforming in murine fibroblasts and transgenic mice expressing HCV core protein develop HCC. The HCV core protein can modify intracellular signaling pathways which inhibit immune-mediated cell killing. HCV core blocks TNF α -mediated apoptosis through interactions with the TNF α and their receptor [6, 69].

TNF α is an inflammatory cytokine secreted by activated macrophages and T-cells, which play an important role in acute infections. TNF α induces FAS-mediated apoptosis and helps to clear infected cells. HCV core binds to the cytoplasmic domains of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1), lymphotoxin b, and gC1q receptors and stops FAS/TNF α receptor signaling. Corruption of TNF α mediated signaling helps in the survival of infected hepatocytes and promotes persistent HCV infection [114, 132].

Expression of HCV core activates NF- κ B, a transcription factor involved in regulating the immune response. There are elevated levels of NF- κ B protein and increased NF- κ B DNA binding activity in chronic infected HCV hepatocytes. The core has been shown to adjust the activity of transcription factors and cytokines that could promote cellular transformation and HCC [6, 47].

Hindering interferon action promotes persistent infection and may evade from cellular signaling pathways that could ultimately lead to cellular transformation. In addition, HCV proteins activate cellular oncoproteins and inactivate tumor suppressors, such as p53, CREB2/LZIP, and the retinoblastoma protein (pRB) [6, 68] (Fig. 3 and 4).

Conclusion

Several viruses with oncogenic ability, with different mechanisms depending on different host factors, induce cell proliferation and lead to tumors in animals and humans.

The oncogenic RNA viruses encode transforming proteins to stimulate tumor formation. The small viral genomes are integrated into host cell chro-

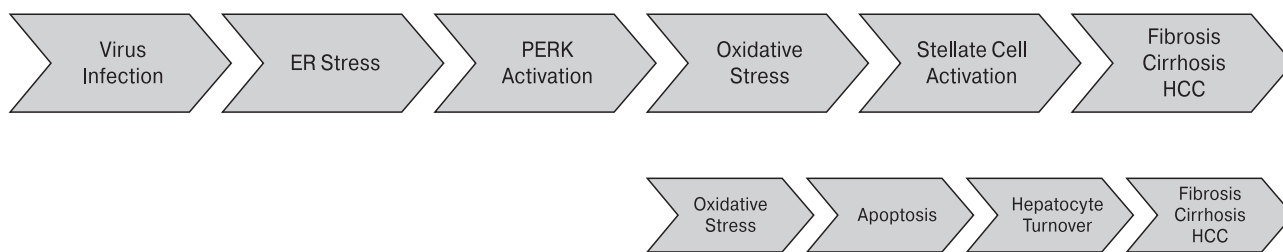


Figure 3. Chronic virus infection and cell stress. Sequential steps from virus infection through cell stress and leading to liver injury and HCC are shown

mosomes and cause mutations and chromosomal rearrangements that cause cancer. Both the epidemiology of cancer and the biology of RNA viruses show the role of any agent being thought as a factor. Although RNA viruses can transform cells *in vitro* or even in animals, the condition in humans is likely to be much more complex. Viruses as direct transforming agents and cofactors are certainly important in most common cancers. Probably, most mechanisms of carcinogenesis may involve a combination of genetic alterations, immune system dysfunctions, and viral infections. The review in this article emphasizes the importance of RNA viruses and their mechanisms that can lead to cancer.

More investigation of the role of RNA viruses in cancer may result in new approaches that could lead to better diagnosis, prevention, and treatment of these cancers. The antiviral agents in cancer therapy should be considered, as they are in other infection-associated cancer types such as hepatocellular carcinoma, brain tumors, sarcoma, nasopharyngeal and some hematopoietic cancers.

Obviously, the study of how RNA viruses interrupt cell cycle regulatory and intercellular signaling mechanisms to achieve their replicative success continues to reach a novel insight into multiple human diseases, including cancer.

Ubiquitination is a post-translational modification which influences protein structure, cellular localization and activity. Many viral proteins have also evolved to play DUB like roles. Many oncogenic viruses interrupt the host deubiquitinase function or exploit their own DUBs to drive cellular transformation.

Seven cellular DUBs-CYLD, USP7, USP11, USP15, USP20, A20 and STAMBPL1 (AMSH-LP) out of 100 DUBs have been related to viral oncoproteins. Cancer associated DUBs (CADs)-DUBs with altered expression or inherent mutation and Cancer related redundant pathway associated DUBs (CRRPADs) are 2 main groups of DUBs. Out of 52 DUBs implicated in cancer, only 7 have been reported as interacting partners for viral oncoproteins. Based on the importance of neoviral DUBs in cellular transformation, an intensive search for specific inhibitors for viral DUBs is important. DUBs in cancer-related pathways would establish them as the cancer chemotherapeutic target for the UPS which has been targeted by drugs. Human RNA viruses that cause cancer include the retrovirus Human T-cell Leukemia virus type I (HTLV-I) and hepatitis C virus (HCV). In addition, AIDS is caused by retrovirus (HIV-1 and -2), developing complications of the immunodeficiency characteristic cancers such as sarcoma in AIDS pa-

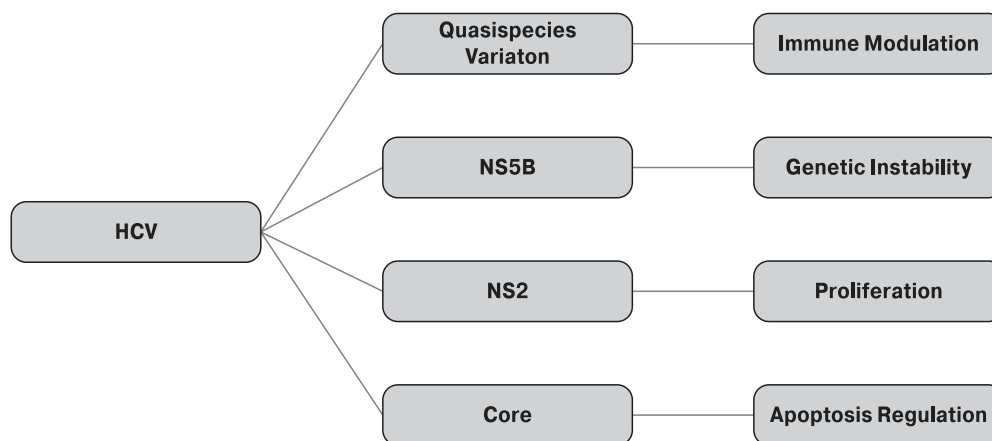


Figure 4. Schematic depiction of the major biological activities that contribute to the transforming activities of HCV

tients. The persistent infection can lead to chronic liver damage and the development of hepatocellular carcinoma is associated with an RNA virus called hepatitis C virus (HCV).

In our article, the roles of some HCV viral proteins in causing cellular damage leading to tumorigenesis in persistently infected patients is described. Moreover, causing malignant hepatocyte transformation by indirect and extra virological factors such as inducing hepatocyte regeneration leading to virological damage or immunological attack and mediators of mutation must be considered. All these interactions between virus and host added to time and environmental factors, determine the ultimate clinical outcome.

HCV infection contributes to HCC by causing chronic inflammation. HTLV-1 starts pro-proliferative and immunomodulating signals through the activation of NF- κ B and its transcriptional regulatory program.

The angioproliferative disease is an excellent example of how cells express distinct gene programs can cooperate in tumor initiation, maintenance and dissemination and also reveal the existence of a virally initiated process of paracrine transformation. Intercellular cooperation is not limited to viral associated tumors but occurs in some aggressive human neoplasia.

The knowledge of retroviral integration sites and transmitted transforming genes can increase the data about oncogenes and tumor suppressors that are found in human malignancies.

The main difference between transforming animal retroviruses and human tumor viruses is that oncogenes of human tumor viruses are viral genes, rather than mutated versions of cellular genes.

Retroviruses that have v-onc genes cause malignancies, including sarcomas and hematopoietic cell tumors, in a short period of time.

Many retroviruses do not have viral oncogenes, but they integrate their genome into protooncogenes which activate their expression by proviral insertional mutagenesis, leading to growth and differentiation of the host cells. Based on findings of HTLV1 in leukemic cells in ATL, it seemed to be necessary to find a relationship between virus and disease even before showing the transforming ability of the virus.

In our article, the identification of RNA virus oncogenes and cellular proto-oncogenes, induction of signal transduction pathways, and characterization of tumor suppressor genes were discussed. The dis-

covery of avian sarcoma and acute leukemia viruses as RNA-containing viruses in the retroviridae family was the origin of cancer virology that started one hundred years ago. Laboratory studies on RNA tumor viruses (many of them animal viruses) are highly relevant to human cancer and many of the viral oncogenesis explained by these studies are suitable for human cancers, including those that are not caused by viruses.

Acute transforming viruses that have viral oncogenes inducing tumors rapidly and non-acute retroviruses not carrying oncogenes inducing tumors more slowly, are two groups of oncogenic retroviruses. The Rous sarcoma virus (RSV) is a prototypic acute transforming retrovirus that has v-src derived from the cellular proto-oncogene c-src.

Non-acute retroviruses typically induce tumors by the influence of the viral long terminal repeats (LTRs). Transforming virus SFFV as well as a helper virus (F-MuLV) makes leukemogenesis by the Friend MuLV complex by recombinant between F-MuLV and an endogenous MuLV-related provirus. MMTV initially infects cells of the immune system by insertional activation of proto-oncogenes and carcinogenesis occurs. The roles of the viral Tax protein and alternative splicing in the X region of the HTLV-I genome and their potential roles in oncogenesis are described.

Tumors often have a large population of proliferative cells and might be permissive for viral replication. The discovery of virus sequences in tumors could represent a major challenge for the future.

The presence of the viral gene products in cancer may be exploited in novel therapies that distinguish these cells from normal cells. Targeting cancer cells would have more advantages than traditional modalities such as chemotherapy and radiation, including significant toxicities. Useful strategies for vaccine design to hinder primary infection and targeted therapies for the treatment of disease must be carefully considered in the future.

Additional information

Declaration of conflicting interests. The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding. The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

1. Ajiro M., Zheng Z.M. Oncogenes and RNA splicing of human tumor viruses. *Emerg. Microbes Infect.*, 2014, vol. 3, no. 9: e63. doi: 10.1038/emi.2014.62
2. Alibek K., Kakpenova A., Mussabekova A., Sypabekova M., Karatayeva N. Role of viruses in the development of breast cancer. *Infect. Agent Cancer*, 2013, no. 8: 32. doi: 10.1186/1750-9378-8-32
3. Alter M.J. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology*, 2002, vol. 36, no. 5, suppl. 1, pp. S93–S98. doi: 10.1053/jhep.2002.36389
4. Amano M., Setoyama M., Grant A., Kerdel F.A. Human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) infection — dermatological implications. *Int. J. Dermatol.*, 2011, vol. 50, no. 8, pp. 915–20. doi: 10.1111/j.1365-4632.2011.04882.x

5. Andersson J. An Overview of Epstein-Barr Virus: from Discovery to Future Directions for Treatment and Prevention. *Herpes*, 2000, vol. 7, no. 3, pp. 76–82
6. Banerjee A., Ray R.B., Ray R. Oncogenic potential of hepatitis C virus proteins. *Viruses*, 2010, vol. 2, no. 9, pp. 2108–2133. doi: 10.3390/v2092108
7. Batra N., Ghag I., Babu K., Divanji T. Reviewing Oncogenes and Proto-Oncogenes. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*, 2021, vol. 8, iss. 3, pp. 458–479. doi: 10.32628/IJSRST2183100
8. Cancer a Comprehensive Treatise 2: Etiology: Viral Carcinogenesis. Ed. Becker F. Springer, 2013. 455 p.
9. Becsei-Kilborn E. Scientific discovery and scientific reputation: the reception of Peyton Rous' discovery of the chicken sarcoma virus. *J. Hist. Biol.*, 2010, vol. 43, no. 1, pp. 111–157. doi: 10.1007/s10739-008-9171-y
10. Beemon K., Rosenberg N. Mechanisms of Oncogenesis by Avian and Murine Retroviruses. *Cancer Associated Viruses*, 2011, pp. 677–704.
11. Beuten J., Gelfond J.A., Franke J.L., Shook S., Johnson-Pais T.L., Thompson I.M., Leach R.J. Single and multivariate associations of MSR1, ELAC2, and RNASEL with prostate cancer in an ethnic diverse cohort of men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2010, vol. 19, no. 2, pp. 588–599. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0864
12. Bevilacqua G. The Viral Origin of Human Breast Cancer: From the Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) to the Human Betaretrovirus (HBRV). *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 8: 1704. doi: 10.3390/v14081704
13. Birkenheuer C.H., Brewster C.D., Quackenbush S.L., Rovnak J. Retroviral cyclin controls cyclin-dependent kinase 8-mediated transcription elongation and reinitiation. *J. Virol.*, 2015, vol. 89, no. 10, pp. 5450–5461. doi: 10.1128/JVI.00464-15
14. Boeras I., Sakalian M., West J.T. Translation of MMTV Gag requires nuclear events involving splicing motifs in addition to the viral Rem protein and RmRE. *Retrovirology*, 2012, no. 9: 8. doi: 10.1186/1742-4690-9-8
15. Brownell J., Bruckner J., Wagoner J., Thomas E., Loo Y.M., Gale M Jr, Liang T.J., Polyak S.J. Direct, interferon-independent activation of the CXCL10 promoter by NF- κ B and interferon regulatory factor 3 during hepatitis C virus infection. *J. Virol.*, 2014, vol. 88, no. 3, pp. 1582–1590. doi: 10.1128/JVI.02007-13
16. Campbell-Yesufu O.T., Gandhi R.T. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clin. Infect. Dis.*, 2011, vol. 52, no. 6, pp. 780–787. doi: 10.1093/cid/ciq248
17. Chamanian M., Purzycka K.J., Wille P.T., Ha J.S., McDonald D., Gao Y., Le Grice S.F., Arts E.J. A cis-acting element in retroviral genomic RNA links Gag-Pol ribosomal frameshifting to selective viral RNA encapsidation. *Cell Host Microbe*, 2013, vol. 13, no. 2, pp. 181–192. doi: 10.1016/j.chom.2013.01.007
18. Chen A.A., Gheit T., Franceschi S., Tommasino M., Clifford G.M.; IARC HPV Variant Study Group. Human Papillomavirus 18 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide. *J. Virol.*, 2015, vol. 89, no. 20, pp. 10680–10687. doi: 10.1128/JVI.01747-15
19. Cherian M.A., Baydoun H.H., Al-Saleem J., Shkriabai N., Kvaratskhelia M., Green P., Ratner L. Akt Pathway Activation by Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Tax Oncoprotein. *J. Biol. Chem.*, 2015, vol. 290, no. 43, pp. 26270–26281. doi: 10.1074/jbc.M115.684746
20. Coffin J.M. The discovery of HTLV-1, the first pathogenic human retrovirus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2015, vol. 112, no. 51, pp. 15525–15529. doi: 10.1073/pnas.1521629112
21. Cook L.B., Elemans M., Rowan A.G., Asquith B. HTLV-1: persistence and pathogenesis. *Virology*, 2013, vol. 435, no. 1, pp. 131–140. doi: 10.1016/j.virol.2012.09.028
22. Currer R., Van Duyn R., Jaworski E., Guendel I., Sampey G., Das R., Narayanan A., Kashanchi F. HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Front. Microbiol.*, 2012, no. 3: 406. doi: 10.3389/fmicb.2012.00406
23. Delbridge A.R., Grabow S., Strasser A., Vaux D.L. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer*, 2016, vol. 16, no. 2, pp. 99–109. doi: 10.1038/nrc.2015.17
24. Deng L., Meng T., Chen L., Wei W., Wang P. The role of ubiquitination in tumorigenesis and targeted drug discovery. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2020, vol. 5, no. 1: 11. doi: 10.1038/s41392-020-0107-0
25. Downey R.F., Sullivan F.J., Wang-Johanning F., Ambs S., Giles F.J., Glynn S.A. Human endogenous retrovirus K and cancer: Innocent bystander or tumorigenic accomplice? *Int. J. Cancer*, 2015, vol. 137, no. 6, pp. 1249–1257. doi: 10.1002/ijc.29003
26. Eggleton J.S., Nagalli S. Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), 2023. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–.
27. El-Serag H.B., Mason A.C. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch. Intern. Med.*, 2000, vol. 160, no. 21, pp. 3227–3230. doi: 10.1001/archinte.160.21.3227
28. Elemento O. The road from Rous sarcoma virus to precision medicine. *J. Exp. Med.*, 2021, vol. 218, no. 4: e20201754. doi: 10.1084/jem.20201754
29. Ernzen K.J., Panfil A.R. Regulation of HTLV-1 transformation. *Biosci. Rep.*, 2022, vol. 42, no. 3: BSR20211921. doi: 10.1042/BSR20211921
30. Eshghifar N., Farrokhi N., Naji T., Zali M. Tumor suppressor genes in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterol. Hepatol. Bed. Bench.*, 2017, vol. 10, no. 1, pp. 3–13.
31. Fan H. Cell transformation by RNA viruses: an overview. *Viruses*, 2011, vol. 3, no. 6, pp. 858–860. doi: 10.3390/v3060858
32. Fan H., Johnson C. Insertional oncogenesis by non-acute retroviruses: implications for gene therapy. *Viruses*, 2011, vol. 3, no. 4, pp. 398–422. doi: 10.3390/v3040398
33. Farci P. New insights into the HCV quasispecies and compartmentalization. *Semin. Liver Dis.*, 2011, vol. 31, no. 4, pp. 356–374. doi: 10.1055/s-0031-1297925
34. Ghosh Z.A., Mollaei H.R., Arefinia N. The Role of DNA Viruses in Human Cancer. *Cancer Inform.*, 2023, no. 22: 11769351231154186. doi: 10.1177/11769351231154186
35. Fazlalipour M., Keyvani H., Monavari S.H., Mollaei H.R. Expression, Purification and Immunogenic Description of a Hepatitis C Virus Recombinant CoreE1E2 Protein Expressed by Yeast *Pichia pastoris*. *Jundishapur J. Microbiol.*, 2015, vol. 8, no. 4: e17157. doi: 10.5812/jjm.8(4)2015.17157

36. Fochi S., Mutascio S., Bertazzoni U., Zipeto D., Romanelli M.G. HTLV Deregulation of the NF- κ B Pathway: An Update on Tax and Antisense Proteins Role. *Front. Microbiol.*, 2018, no. 9: 285. doi: 10.3389/fmicb.2018.00285
37. Freed E.O. HIV-1 replication. *Somat. Cell. Mol. Genet.*, 2001, vol. 26, no. 1-6, pp. 13–33. doi: 10.1023/a:1021070512287
38. Gallo R.C. Research and discovery of the first human cancer virus, HTLV-1. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2011, vol. 24, no. 4, pp. 559–565. doi: 10.1016/j.beha.2011.09.012
39. Garcia-Montojo M., Doucet-O'Hare T., Henderson L., Nath A. Human endogenous retrovirus-K (HML-2): a comprehensive review. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2018, vol. 44, no. 6, pp. 715–738. doi: 10.1080/1040841X.2018.1501345
40. Gatz M.L., Watt J.C., Marriott S.J. Cellular transformation by the HTLV-I Tax protein, a jack-of-all-trades. *Oncogene*, 2003, vol. 22, no. 33, pp. 5141–5149. doi: 10.1038/sj.onc.1206549
41. Geijtenbeek T.B., Kwon D.S., Torensma R., van Vliet S.J., van Duijnhoven G.C., Middel J., Cornelissen I.L., Nottet H.S., KewalRamani V.N., Littman D.R., Figdor C.G., van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, 2000, vol. 100, no. 5, pp. 587–597. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80694-7
42. Gessain A., Mahieux R. Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. *Rev. Neurol. (Paris)*, 2012, vol. 168, no. 3, pp. 257–269. doi: 10.1016/j.neurol.2011.12.006
43. Gillet N.A., Malani N., Melamed A., Gormley N., Carter R., Bentley D., Berry C., Bushman F.D., Taylor G.P., Bangham C.R. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. *Blood*, 2011, vol. 117, no. 11, pp. 3113–3122. doi: 10.1182/blood-2010-10-312926
44. Grulich A.E., Vajdic C.M. The epidemiology of cancers in human immunodeficiency virus infection and after organ transplantation. *Semin. Oncol.*, 2015, vol. 42, no. 2, pp. 247–257. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.12.029
45. Harhaj E.W., Giam C.Z. NF- κ B signaling mechanisms in HTLV-1-induced adult T-cell leukemia/lymphoma. *FEBS J.*, 2018, vol. 285, no. 18, pp. 3324–3336. doi: 10.1111/febs.14492
46. Hashikura Y., Umeki K., Umekita K., Nomura H., Yamamoto I., Hasegawa H., Yanagihara K., Okayama A. The diversity of the structure and genomic integration sites of HTLV-1 provirus in MT-2 cell lines. *Hum. Cell*, 2016, vol. 29, no. 3, pp. 122–129. doi: 10.1007/s13577-016-0136-8
47. Hassan M., Selimovic D., Ghozlan H., Abdel-Kader O. Induction of high-molecular-weight (HMW) tumor necrosis factor(TNF) alpha by hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3) in liver cells is AP-1 and NF-kappaB-dependent activation. *Cell. Signal.*, 2007, vol. 19, no. 2, pp. 301–311. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.07.002
48. Heride C., Urbé S., Clague M.J. Ubiquitin code assembly and disassembly. *Curr. Biol.*, 2014, vol. 24, no. 6, pp. R215–R220. doi: 10.1016/j.cub.2014.02.002
49. Hofacre A., Fan H. Jaagsiekte sheep retrovirus biology and oncogenesis. *Viruses*, 2010, vol. 2, no. 12, pp. 2618–2648. doi: 10.3390/v2122618
50. Howley P.M., Knipe D.M., Cohen J.L., Damania B.A. Fields Virology: DNA Viruses. *Lippincott Williams & Wilkins*, 2021.
51. Hu W.Y., Myers C.P., Kilzer J.M., Pfaff S.L., Bushman F.D. Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference. *Curr. Biol.*, 2002, vol. 12, no. 15, pp. 1301–1311. doi: 10.1016/s0960-9822(02)00975-2
52. Huang Q., Niu Z., Han J., Liu X., Lv Z., Li H., Yuan L., Li X., Sun S., Wang H., Huang X. HTLV-1 Tax upregulates early growth response protein 1 through nuclear factor- κ B signaling. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 31, pp. 51123–51133. doi: 10.18632/oncotarget.17699
53. Huang Y., Staschke K., De Francesco R., Tan S.L. Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication? *Virology*, 2007, vol. 364, no. 1, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.virol.2007.01.042
54. Irshad M., Gupta P., Irshad K. Molecular basis of hepatocellular carcinoma induced by hepatitis C virus infection. *World J. Hepatol.*, 2017, vol. 9, no. 36, pp. 1305–1314. doi: 10.4254/wjh.v9.i36.1305
55. Johnson C., Hung F. Jaagsiekte Sheep Retrovirus and Lung Cancer. In: Cancer Associated Viruses. *Springer*, 2011, pp. 755–791.
56. Kakisi O.K., Robinson M.J., Tettmar K.I., Tedder R.S. The rise and fall of XMRV. *Transfus. Med.*, 2013, vol. 23, no. 3, pp. 142–151. doi: 10.1111/tme.12049
57. Kannian P., Yin H., Doueiri R., Lairmore M.D., Fernandez S., Green P.L. Distinct transformation tropism exhibited by human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 is the result of postinfection T cell clonal expansion. *J. Virol.*, 2012, vol. 86, no. 7, pp. 3757–3766. doi: 10.1128/JVI.06900-11
58. Katoh I., Kurata S. Association of endogenous retroviruses and long terminal repeats with human disorders. *Front. Oncol.*, 2013, no. 3: 234. doi: 10.3389/fonc.2013.00234
59. Katsura Y., Asai S. Evolutionary Medicine of Retroviruses in the Human Genome. *Am. J. Med. Sci.*, 2019, vol. 358, no. 6, pp. 384–388. doi: 10.1016/j.amjms.2019.09.007
60. Kengne M., Tsata D.C.W., Ndomgue T., Nwobegahay J.M. Prevalence and risk factors of HTLV-1/2 and other blood borne infectious diseases among blood donors in Yaounde Central Hospital, Cameroon. *Pan. Afr. Med. J.*, 2018, no. 30: 125. doi: 10.11604/pamj.2018.30.125.14802
61. Keyvani H., Fazlalipour M., Monavari S.H., Mollaie H.R. Hepatitis C virus — proteins, diagnosis, treatment and new approaches for vaccine development. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2012, vol. 13, no. 12, pp. 5931–5949.
62. Kim S.G., Zhou J., Solomon C., Zheng Y., Suzuki T., Chen M., Song S., Jiang N., Cho S., Mao J.J. Effects of growth factors on dental stem/progenitor cells. *Dent. Clin. North Am.*, 2012, vol. 56, no. 3, pp. 563–575. doi: 10.1016/j.cden.2012.05.001
63. Klein G. Perspectives in studies of human tumor viruses. *Front. Biosci.*, 2002, vol. 7, pp. d268–d274. doi: 10.2741/A726
64. Knipe D., Howley P., Griffin D., Lamb R., Martin M., Roizman B., Straus S. Fields Virology. Vol. 1 and 2. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013.
65. Kontomanolis E.N., Koutras A., Syllaios A., Schizas D., Mastoraki A., Garmpis N., Diakosavvas M., Angelou K., Tsatsaris G., Pagkalos A., Ntounis T., Fasoulakis Z. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res.*, 2020, vol. 40, no. 11, pp. 6009–6015. doi: 10.21873/anticancer.14622
66. Korf B.R. Neurofibromatosis. *Handb. Clin. Neurol.*, 2013, vol. 111, pp. 333–340. doi: 10.1016/B978-0-444-52891-9.00039-7

67. Lin M.V., King L.Y., Chung R.T. Hepatitis C virus-associated cancer. *Annu. Rev. Pathol.*, 2015, vol. 10, pp. 345–370. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040323
68. Machida K., Liu J.C., McNamara G., Levine A., Duan L., Lai M.M. Hepatitis C virus causes uncoupling of mitotic checkpoint and chromosomal polyploidy through the Rb pathway. *J. Virol.*, 2009, vol. 83, no. 23, pp. 12590–12600. doi: 10.1128/JVI.02643-08
69. Malekshahi, A., Alamdary, A., Safarzadeh, A., Khavandegar, A., Nikoo, H. R., Safavi, M., Ajorloo, M. Potential Roles of Core and Core+1 Proteins During the Chronic Phase of Hepatitis C Virus Infection. *Future Virology*, 2023, vol. 18, no. 3, pp. 193–207. doi: 10.2217/fvl-2022-0117
70. Manns M.P., Buti M., Gane E., Pawlotsky J.M., Razavi H., Terrault N., Younossi Z. Hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2017, no. 3: 17006. doi: 10.1038/nrdp.2017.6
71. Marriott A.C., Dimmock N.J. Defective interfering viruses and their potential as antiviral agents. *Rev. Med. Virol.*, 2010, vol. 20, no. 1, pp. 51–62. doi: 10.1002/rmv.641
72. Martin I.V., Borkham-Kamphorst E., Zok S., van Roeyen C.R., Eriksson U., Boor P., Hittatiya K., Fischer H.P., Wasmuth H.E., Weiskirchen R., Eitner F., Floege J., Ostendorf T. Platelet-derived growth factor (PDGF)-C neutralization reveals differential roles of PDGF receptors in liver and kidney fibrosis. *Am. J. Pathol.*, 2013, vol. 182, no. 1, pp. 107–117. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.09.006
73. Martin J.L., Maldonado J.O., Mueller J.D., Zhang W., Mansky L.M. Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. *Viruses*, 2016, vol. 8, no. 2: 31. doi: 10.3390/v8020031
74. Martinez M.P., Al-Saleem J., Green P.L. Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*, 2019, vol. 16, no. 1: 21. doi: 10.1186/s12977-019-0483-0
75. Maślowski B.M., Néel B.D., Wu Y., Wang L., Rodrigues N.A., Gillet G., Bédard P.A. Cellular processes of v-Src transformation revealed by gene profiling of primary cells — implications for human cancer. *BMC Cancer*, 2010, no. 10: 41. doi: 10.1186/1471-2407-10-41
76. McLaughlin-Drubin M.E., Munger K. Viruses associated with human cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, vol. 1782, no. 3, pp. 127–150. doi: 10.1016/j.bbadis.2007.12.005
77. Mesri E.A., Feitelson M.A., Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell. Host Microbe*, 2014, vol. 15, no. 3, pp. 266–282. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.011
78. Monavari S.H., Keyvani H., Mollaie H., Fazlalipour M., Salehi-Vaziri M., Bokharaei-Salim F., Mollaie R., Sadeghi F. Detection of human T-cell lymphotropic virus Type-1 among patients with malignant hematological diseases in Capital of Iran, Tehran. *J. Gen. Mol. Virol.*, 2011, vol. 3, no. 5, pp. 67–70.
79. Montanheiro P., Vergara M.P., Smid J., da Silva Duarte A.J., de Oliveira A.C., Casseb J. High production of RANTES and MIP-1alpha in the tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). *J. Neuroimmunol.*, 2007, vol. 188, no. 1–2, pp. 138–142. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.05.015
80. Moore P.S., Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat. Rev. Cancer.*, 2010, vol. 10, no. 12, pp. 878–889. doi: 10.1038/nrc2961
81. Morse H.C. 3rd, Hartley J.W., Fredrickson T.N., Yetter R.A., Majumdar C., Cleveland J.L., Rapp U.R. Recombinant murine retroviruses containing avian v-myc induce a wide spectrum of neoplasms in newborn mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, no. 18, pp. 6868–6872. doi: 10.1073/pnas.83.18.6868
82. Neutzner M., Neutzner A. Enzymes of ubiquitination and deubiquitination. *Essays Biochem.*, 2012, vol. 52, pp. 37–50. doi: 10.1042/bse0520037
83. Nosaka K., Matsuoka M. Adult T-cell leukemia-lymphoma as a viral disease: subtypes based on viral aspects. *Cancer Sci.*, 2021, vol. 112, no. 5, pp. 1688–1694. doi: 10.1111/cas.14869
84. Olah E. Cancer Susceptibility Genes in Heritable Cancer Syndromes. *Nőgyógyászati Onkológia*, 1997, vol. 2, pp. 119–128.
85. Overbaugh J., Bangham C.R. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. *Science*, 2001, vol. 292, no. 5519, pp. 1106–1109. doi: 10.1126/science.1059128
86. Panasenko O.O. Identification of ubiquitinated proteins. *Materials and Methods*, 2014, 25 p. doi: 10.13070/mm.en.4.827
87. Payne L.N. Retrovirus-induced disease in poultry. *Poult. Sci.*, 1998, vol. 77, no. 8, pp. 1204–1212. doi: 10.1093/ps/77.8.1204
88. Payton S. XMRV in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.*, 2010, vol. 7, p. 3. doi: 10.1038/nrurol.2009.240
89. Penin F., Dubuisson J., Rey F.A., Moradpour D., Pawlotsky J.M. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, 2004, vol. 39, no. 1, pp. 5–19. doi: 10.1002/hep.20032
90. Podschwadt P., Malyschkina A., Windmann S., Werner T., Hansen W., Bayer W. A detailed analysis of F-MuLV- and SFFV-infected cells in Friend virus-infected mice reveals the contribution of both F-MuLV- and SFFV-infected cells to the interleukin-10 host response. *Retrovirology*, 2022, vol. 19, no. 1: 29. doi: 10.1186/s12977-022-00613-4
91. Pujari R., Hunte R., Thomas R., van der Weyden L., Rauch D., Ratner L., Nyborg J.K., Ramos J.C., Takai Y., Shembade N. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) tax requires CADM1/TSLC1 for inactivation of the NF-κB inhibitor A20 and constitutive NF-κB signaling. *PLoS Pathog.*, 2015, vol. 11, no. 3: e1004721. doi: 10.1371/journal.ppat.1004721
92. Reyes G.R. The nonstructural NS5A protein of hepatitis C virus: an expanding, multifunctional role in enhancing hepatitis C virus pathogenesis. *J. Biomed. Sci.*, 2002, vol. 9, no. 3, pp. 187–197. doi: 10.1007/BF02256065
93. Robinson M.J., Erlwein O., McClure M.O. Xenotropic murine leukaemia virus-related virus (XMRV) does not cause chronic fatigue. *Trends Microbiol.*, 2011, vol. 19, no. 11, pp. 525–529. doi: 10.1016/j.tim.2011.08.005
94. Rodriguez J.J., Goff S.P. Xenotropic murine leukemia virus-related virus establishes an efficient spreading infection and exhibits enhanced transcriptional activity in prostate carcinoma cells. *J. Virol.*, 2010, vol. 84, no. 5, pp. 2556–2562. doi: 10.1128/JVI.01969-09
95. Rogo L.D., Akogwu S., Umar U.Z., Aliyu A.M., Aminu B.M. The genetic and molecular studies of hepatitis C virus: a review. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 2011, vol. 4, no. 1, pp. 72–74.
96. Rosadas C., Taylor G.P. Mother-to-Child HTLV-1 Transmission: Unmet Research Needs. *Front. Microbiol.*, 2019, no. 10: 999. doi: 10.3389/fmicb.2019.00999

97. Roskoski R. Jr. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 324, no. 4, pp. 1155–1164. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.171
98. Ross S.R. Mouse mammary tumor virus molecular biology and oncogenesis. *Viruses*, 2010, vol. 2, no. 9, pp. 2000–2012. doi: 10.3390/v2092000
99. Roy S., Bondada M.S., Zhang Y., Moffat K., Nair V., Yao Y. Proviral ALV-LTR Sequence Is Essential for Continued Proliferation of the ALV-Transformed B Cell Line. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 19: 11263. doi: 10.3390/ijms231911263
100. Rubin H. The early history of tumor virology: Rous, RIF, and RAV. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, no. 35, pp. 14389–14396. doi: 10.1073/pnas.1108655108
101. Salavatiha Z., Soleimani-Jelodar R., Jalilvand S. The role of endogenous retroviruses-K in human cancer. *Rev. Med. Virol.*, 2020, vol. 30, no. 6, pp. 1–13. doi: 10.1002/rmv.2142
102. Satou Y., Yasunaga J., Yoshida M., Matsuoka M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, no. 3, pp. 720–725. doi: 10.1073/pnas.0507631103
103. Saxena N., Kumar V. Oncogenic viruses: DUBbing their way to cancer. *Virol. Discov.*, 2013, vol. 1. doi: 10.7243/2052-6202-1-5
104. Schlager R., Choe D.J., Brown K.R., Thaker H.M., Singh I.R. XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, no. 38, pp. 16351–16356. doi: 10.1073/pnas.0906922106
105. Sethi A.K., Celentano D.D., Gange S.J., Gallant J.E., Vlahov D., Farzadegan H. High-risk behavior and potential transmission of drug-resistant HIV among injection drug users. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2004, vol. 35, no. 5, pp. 503–510. doi: 10.1097/00126334-200404150-00008
106. Şevik M. Oncogenic viruses and mechanisms of oncogenesis. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 2012, vol. 36, no. 4, pp. 323–329.
107. Shi K., Pandey K.K., Bera S., Vora A.C., Grandgenett D.P., Aihara H. A possible role for the asymmetric C-terminal domain dimer of Rous sarcoma virus integrase in viral DNA binding. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 2: e56892. doi: 10.1371/journal.pone.0056892
108. Shiels M.S., Pfeiffer R.M., Hall H.I., Li J., Goedert J.J., Morton L.M., Hartge P., Engels E.A. Proportions of Kaposi sarcoma, selected non-Hodgkin lymphomas, and cervical cancer in the United States occurring in persons with AIDS, 1980–2007. *JAMA*, 2011, vol. 305, no. 14, pp. 1450–1459. doi: 10.1001/jama.2011.396
109. Shukrun M., Jabareen A., Abou-Kandil A., Chamias R., Aboud M., Huleihel M. HTLV-1 Tax oncoprotein inhibits the estrogen-induced-ER α -Mediated BRCA1 expression by interaction with CBP/p300 cofactors. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 2: e89390. doi: 10.1371/journal.pone.0089390
110. Silverman R.H., Nguyen C., Weight C.J., Klein E.A. The human retrovirus XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome. *Nat. Rev. Urol.*, 2010, vol. 7, no. 7, pp. 392–402. doi: 10.1038/nrurol.2010.77
111. Simmons W. The role of human endogenous retroviruses (HERV-K) in the pathogenesis of human cancers. *Mol. Biol.*, 2016, vol. 5, no. 169: 2.
112. Sugata K., Yasunaga J., Kinoshita H., Mitobe Y., Furuta R., Mahgoub M., Onishi C., Nakashima K., Ohshima K., Matsuoka M. HTLV-1 Viral Factor HBZ Induces CCR4 to Promote T-cell Migration and Proliferation. *Cancer Res.*, 2016, vol. 76, no. 17, pp. 5068–5079. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0361
113. Lok A.S. Hepatitis B: 50 years after the discovery of Australia antigen. *J. Viral. Hepat.*, 2016, vol. 23, no. 1, pp. 5–14. doi: 10.1111/jvh.12444
114. Sun J., Bodola F., Fan X., Irshad H., Soong L., Lemon S.M., Chan T.S. Hepatitis C virus core and envelope proteins do not suppress the host's ability to clear a hepatic viral infection. *J. Virol.*, 2001, vol. 75, no. 24, pp. 11992–11998. doi: 10.1128/JVI.75.24.11992-11998.2001
115. Sun T., Liu Z., Yang Q. The role of ubiquitination and deubiquitination in cancer metabolism. *Mol. Cancer*, 2020, vol. 19, no. 1: 146. doi: 10.1186/s12943-020-01262-x
116. Svoboda J. Cell Association in Rous Sarcoma Virus (RSV) Rescue and Cell Infection. *Folia Biol. (Praha)*, 2015, vol. 61, no. 5, pp. 161–167.
117. Svoboda J. Rous sarcoma virus centennial in Folia Biologica. *Folia Biol. (Praha)*, 2013, vol. 59, no. 3, pp. 103–104.
118. Taguchi T., Nagano-Fujii M., Akutsu M., Kadoya H., Ohgimoto S., Ishido S., Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. *J. Gen. Virol.*, 2004, vol. 85, pt 4, pp. 959–969. doi: 10.1099/vir.0.19513-0
119. Taylor G.P., Matsuoka M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. *Oncogene*, 2005, vol. 24, no. 39, pp. 6047–6057. doi: 10.1038/sj.onc.1208979
120. Telesnitsky A., Goff S.P. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. In: *Retroviruses*. Eds: Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
121. Tidyman W.E., Rauen K.A. Pathogenetics of the RASopathies. *Hum. Mol. Genet.*, 2016, vol. 25, no. R2, pp. R123–R132. doi: 10.1093/hmg/ddw191
122. Toroney R., Nallagatla S.R., Boyer J.A., Cameron C.E., Bevilacqua P.C. Regulation of PKR by HCV IRES RNA: importance of domain II and NSSA. *J. Mol. Biol.*, 2010, vol. 400, no. 3, pp. 393–412. doi: 10.1016/j.jmb.2010.04.059
123. Urisman A., Molinaro R.J., Fischer N., Plummer S.J., Casey G., Klein E.A., Malathi K., Magi-Galluzzi C., Tubbs R.R., Ganem D., Silverman R.H., DeRisi J.L. Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog.*, 2006, vol. 2, no. 3: e25. doi: 10.1371/journal.ppat.0020025
124. Vidya Vijayan K.K., Karthigeyan K.P., Tripathi S.P., Hanna L.E. Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections. *Front. Immunol.*, 2017, no. 8: 580. doi: 10.3389/fimmu.2017.00580
125. Vogt P.K. Retroviral oncogenes: a historical primer. *Nat. Rev. Cancer*, 2012, vol. 12, no. 9, pp. 639–648. doi: 10.1038/nrc3320
126. Vurusaner B., Poli G., Basaga H. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012, vol. 52, no. 1, pp. 7–18. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.035

127. Watanabe T. Adult T-cell leukemia: molecular basis for clonal expansion and transformation of HTLV-1-infected T cells. *Blood*, 2017, vol. 129, no. 9, pp. 1071–1081. doi: 10.1182/blood-2016-09-692574
128. Welsh J. Modeling Breast Cancer in Animals — Considerations for Prevention and Treatment Studies. *Animal Models for the Study of Human Disease*. Academic Press, 2017, pp. 925–948.
129. Withers J.B., Beemon K.L. The structure and function of the rous sarcoma virus RNA stability element. *J. Cell. Biochem.*, 2011, vol. 112, no. 11, pp. 3085–3092. doi: 10.1002/jcb.23272
130. Yasunaga J.I. Viral, genetic, and immune factors in the oncogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Hematol.*, 2023, vol. 117, no. 4, pp. 504–511. doi: 10.1007/s12185-023-03547-5
131. Zampino R., Pisaturo M.A., Cirillo G., Marrone A., Macera M., Rinaldi L., Stanzone M., Durante-Mangoni E., Gentile I., Sagnelli E., Signoriello G., Miraglia Del Giudice E., Adinolfi L.E., Coppola N. Hepatocellular carcinoma in chronic HBV-HCV co-infection is correlated to fibrosis and disease duration. *Ann. Hepatol.*, 2015, vol. 14, no. 1, pp. 75–82.
132. Zhu N., Ware C.F., Lai M.M. Hepatitis C virus core protein enhances FADD-mediated apoptosis and suppresses TRADD signaling of tumor necrosis factor receptor. *Virology*, 2001, vol. 283, no. 2, pp. 178–187. doi: 10.1006/viro.2001.0896
133. Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, 1999, vol. 111, no. 6, pp. 581–587. doi: 10.1046/j.1525-1381.1999.99723.x

Авторы:

Фазлалипур М., кандидат наук по вирусологии, ассистент, Сотрудничающего центра ВОЗ по стандартам и исследованиям бешенства, Институт Пастера Ирана, Тегеран, Иран; ассистент Исследовательского центра новых и вновь возникающих инфекционных заболеваний, Институт Пастера Ирана, Тегеран, Иран;

Моллаи Х.Р., кандидат наук по вирусологии, ассистент, Керманский университет медицинских наук, г. Керман, Иран.

Authors:

Fazlalipour M., PhD in Virology; PhD in Virology; Assistant Professor, WHO Collaborating Center for Reference and Research on Rabies, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran; Assistant Professor, Research Center for Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran;

Mollaei H.R., PhD in Virology; Assistant Professor, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

Поступила в редакцию 31.01.2024
Отправлена на доработку 06.04.2024
Принята к печати 14.05.2024

Received 31.01.2024
Revision received 06.04.2024
Accepted 14.05.2024

ХИМЕРНЫЕ ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ФРАГМЕНТ БЕЛКА ШИПА КОРОНАВИРУСА, СТИМУЛИРУЮТ СОЗРЕВАНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

В.Ю. Талаев, Д.В. Новиков, И.Е. Заиченко, М.В. Светлова, Е.В. Воронина,
О.Н. Бабайкина, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев, Н.А. Новикова, А.Ю. Кашников,
В.В. Новиков

ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика
И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

Резюме. Введение. Белки вирусных капсидов могут собираться в вирусоподобные частицы, которые лишены инфекционности и несут антигены исходных вирусов или искусственно введенные антигены других возбудителей. Как минимум некоторые из этих частиц обладают высокой иммуногенностью и могут служить основой перспективных вакцин. В данной работе оценивали действие химерных вирусоподобных частиц, декорированных фрагментом белка шипа коронавируса SARS-CoV-2, на дендритные клетки человека — наиболее активные антигенпрезентирующие клетки, которые играют ключевую роль в индукции первичного иммунного ответа. **Материалы и методы.** Объектом исследования были вирусоподобные частицы, собранные из химерных молекул, содержащих антигены коронавируса SARS-CoV-2. Химерные молекулы были получены с помощью слияния генетической последовательности, кодирующей фрагмент основного капсидного белка VP1 норовируса, с последовательностью, кодирующей фрагмент коронавирусного белка шипа, включая рецептор-связывающий домен. Дендритные клетки получали из моноцитов традиционным способом, и оценивали действие частиц на фенотип и функциональные свойства дендритных клеток в условиях *in vitro*. **Результаты.** Инкубация незрелых дендритных клеток с вирусоподобными частицами индуцировала фенотипическое и функциональное созревание клеток. Фенотипическое созревание проявлялось в значительном росте экспрессии молекулы главного комплекса гистосовместимости HLA-DR, ко-стимулирующих молекул CD80 и CD86, а также маркера зрелости CD83. Фенотип дендритных клеток после инкубации с вирусоподобными частицами в максимальной использованной концентрации 10 мкг/мл не имел достоверных отличий от фенотипа зрелых дендритных клеток положительного контроля. Наряду с фенотипическим созреванием вирусоподобные частицы вызывали многократное усиление продукции провоспалительного фактора некроза опухоли- α , противовоспалительного интерлейкина-10, а также интерлейкина-6, который может стимулировать синтез антител, созревание Т-хелперов 17 типа и воспалительные реакции. Выраженная стимуляция дендритных клеток вирусоподобными частицами, покрытыми антигенами коронавируса, свидетельствует об успешном распознавании частиц. В обсуждении приводятся возможные ме-

Адрес для переписки:

Талаев Владимир Юрьевич
603950, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН НИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (831) 469-79-48.
E-mail: talaev@inbox.ru

Contacts:

Vladimir Yu. Talayev
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya
Yamskaya str., 71, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod
Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-48.
E-mail: talaev@inbox.ru

Для цитирования:

Талаев В.Ю., Новиков Д.В., Заиченко И.Е., Светлова М.В., Воронина Е.В.,
Бабайкина О.Н., Лапин В.А., Мелентьев Д.А., Новикова Н.А.,
Кашников А.Ю., Новиков В.В. Химерные вирусоподобные частицы,
содержащие фрагмент белка шипа коронавируса, стимулируют
созревание дендритных клеток человека // Инфекция и иммунитет.
2024. Т. 14, № 2. С. 227–237. doi: 10.15789/2220-7619-CSP-17612

Citation:

Talayev V.Yu., Novikov D.V., Zaichenko I.Ye., Svetlova M.V., Voronina E.V.,
Babaykina O.N., Lapin V.A., Melentiev D.A., Novikova N.A., Kashnikov A.Yu.,
Novikov V.V. Coronavirus spike protein fragment-containing chimeric virus-
like particles stimulate human dendritic cell maturation // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2,
pp. 227–237. doi: 10.15789/2220-7619-CSP-17612

ханизмы распознавания структур исследуемых вирусоподобных частиц рецепторами дендритных клеток. **Заключение.** Показано, что химерные вирусоподобные частицы индуцируют фенотипическое и функциональное созревание дендритных клеток, которое проявляется в значительном росте экспрессии функционально значимых мембранных молекул, а также в многократном усилении продукции цитокинов с широким спектром функций. По нашему мнению, полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования вирусоподобных частиц на основе норовирусных белков для экспонирования антигенов коронавируса SARS-CoV-2.

Ключевые слова: вирусоподобные частицы, коронавирус, норовирус, дендритные клетки, вакцина.

CORONAVIRUS SPIKE PROTEIN FRAGMENT-CONTAINING CHIMERIC VIRUS-LIKE PARTICLES STIMULATE HUMAN DENDRITIC CELL MATURATION

Talayev V.Yu., Novikov D.V., Zaichenko I.Ye., Svetlova M.V., Voronina E.V., Babaykina O.N., Lapin V.A., Melentiev D.A., Novikova N.A., Kashnikov A.Yu., Novikov V.V.

Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* Viral capsid proteins can assemble into virus-like particles lacking infectivity and bearing parental virus antigens or artificially introduced antigens from other pathogens. At least some of such particles are highly immunogenic and could serve as a platform for promising vaccines. In this work, we assessed an effect of virus-like particles decorated with a SARS-CoV-2 spike protein fragment on human dendritic cell phenotype and functional properties. *Materials and methods.* The virus-like particles were assembled using chimeric molecules obtained by fusing genetic sequences encoding a norovirus major capsid protein VP1 fragment and a coronavirus spike protein fragment, including the receptor-binding domain. Dendritic cells were obtained from monocytes *in vitro*. *Results.* Incubation of immature dendritic cells with virus-like particles induced their phenotypic and functional maturation. The former was revealed by significantly increased expression of HLA-DR, CD80, CD86 and CD83. Dendritic cell phenotype after incubation with virus-like particles at the maximum concentration of 10 µg/ml did not differ significantly from that of mature dendritic cells in positive control. Along with phenotypic maturation, virus-like particles caused a manifold increase in the production of pro-inflammatory tumor necrosis factor-α, anti-inflammatory interleukin-10, as well as interleukin-6, which can stimulate both antibody synthesis and cellular pro-inflammatory reactions. The pronounced stimulation of dendritic cells by virus-like particles coated with coronavirus antigens evidence about successful particle recognition. Finally, we discuss plausible mechanisms for recognition of such virus-like particles by dendritic cell receptors. *Conclusion.* It has been shown that chimeric virus-like particles induced phenotypic and functional dendritic cell maturation, which is manifested by markedly elevated expression of functionally important membrane molecules, as well as a manifold rise in production of cytokines with a wide functional range. In our opinion, the data obtained indicate a promise of using virus-like particles based on norovirus proteins to display SARS-CoV-2 antigens.

Key words: virus-like particles, coronavirus, norovirus, dendritic cells, vaccine.

Введение

Чрезвычайная опасность пандемии коронавирусной болезни 2019 г. потребовала создания вакцины против коронавируса SARS-CoV-2 в беспрецедентно короткие сроки. Первой в мире коронавирусной вакциной, зарегистрированной национальным регулятором для общего применения, стала вакцина Гам-КОВИД-Вак [17], получившая разрешение в Российской Федерации 11 августа 2020 г. После этого в России и за рубежом с использованием как традиционных, так и новейших технологий было создано много других вакцин против коронавируса [24, 34]. Использование этих вакцин принесло огромную пользу человечеству, и процесс совершенствования коронавирусных вакцин и технологий их производства продолжается [24, 34].

Большинство разработанных коронавирусных вакцин используют в качестве основного или единственного антигена белок шипа (белок S) или его фрагменты. Выбор этого антигена в качестве вакцинного определяется протективным эффектом иммунного ответа на белок S, что, в свою очередь, связано с ключевой ролью этого белка в заражении клеток коронавирусом. Морфологически белок S имеет вид булавовидных шипов на поверхности липидной мембраны вириона. Этот белок состоит из одной цепи длиной 1273 аминокислотных остатка (далее — а.о.) в которую входят короткий N-концевой сигнальный пептид и две субъединицы — S1 (а.о. 14–685) и S2 (а.о. 686–1273). В субъединицу S1 входят N-концевой домен (а.о. 14–305) и рецептор-связывающий домен (RBD, а.о. 319–541), а в субъединицу S2 — пептид слияния (а.о. 788–806), два гептапептидных повтора (а.о. 912–984

и 1163–1213), трансмембранный участок (а.о. 1213–1237) и С-концевая последовательность (а.о. 1237–1273), которая в вирионе располагается под его липидной мембраной [35].

Заражение клеток вирусом SARS-CoV-2 начинается со связывания RBD с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2) на наружной мембране клеток дыхательных путей [36, 38]. Это взаимодействие ведет к прикреплению вириона к клетке и поглощению его мембранной везикулой [16, 37]. Затем белок S расщепляется на субъединицы S1 и S2 трансмембранной сериновой протеазой 2 (TMPRSS2) хозяина в сайте расщепления фурином (а.о. 682–689) [18], причем образовавшиеся в результате расщепления две полипептидные цепи остаются нековалентно связанными. Вновь созданный С-конец цепи S1 представлен последовательностью Arg-Arg-Ala-Arg, имеющей сродство к нейропину 1 (NRP1 или CD304). NRP1 сильно экспрессируется эпителием дыхательных путей, эндотелием сосудов и предшественниками обонятельных нейронов. В физиологических условиях NRP1 регулирует разнообразные функции, в частности, рост аксонов, ангиогенез, транспорт веществ через мембраны клеток, стенки сосудов и тканевые барьеры [21, 31]. При инфекции NRP1 служит ко-фактором связывания нескольких вирусов, в том числе, SARS-CoV-2, и взаимодействие с ним значительно повышает эффективность проникновения коронавируса в клетку [7, 11]. После праймирования белка S протеазой TMPRSS2 пептид слияния оказывается вблизи вновь образовавшегося N-конца субъединицы S2. Такое положение позволяет этому пептиду осуществить слияние вирусной и везикулярной мембран, что ведет к проникновению вирусного генома внутрь клетки [15, 33].

В данном исследовании в целях разработки новых коронавирусных вакцин изучались свойства вирусоподобных частиц (VLP), состоящих из химерных молекул, в состав которых входил фрагмент белка S коронавируса SARS-CoV-2, включая домен RBD и NRP1-связывающий мотив. Химерные молекулы были получены с помощью слияния генетической последовательности, кодирующей фрагмент основного капсидного вирусного белка 1 (VP1) норовируса, с последовательностью, кодирующей RBD-содержащий фрагмент белка S нового коронавируса. При этом норовирусный компонент был предназначен для самосборки частиц, декорированных антигенами коронавируса.

VP1 является основным структурным белком норовирусов. Икосаэдрический капсид этих простых вирусов собран из 180 копий белка VP1 с включением одной или двух копий белка VP2 [8, 12, 23]. VP1 состоит из домена обо-

лочка (S) и выступающего домена (P) с короткой шарнирной областью между ними [12, 22]. S-домен критически необходим для образования капсида. Димеризация Р-доменов формирует дугообразные выступы на внешней поверхности вириона. Эти выступы и, особенно, их дистальные части из субдомена P2 с гипервариабельным участком играют важную роль во взаимодействии вириона с ко-факторами связывания, а также в иммунной реактивности макроорганизма [30]. Экспрессия гена VP1 в клетках насекомых [14, 22, 23], растений [26] и млекопитающих [4] может приводить к сборке VLP, которые антигенно и морфологически сходны с настоящими вирионами. Эти VLP исследуются в качестве кандидатов в вакцины против норовирусов — возбудителей острого гастроэнтерита у людей [13]. Кроме того, норовирусные VLP можно использовать в качестве платформы для отображения антигенных эпитопов других патогенов [13]. Целью создания таких конструкций является увеличение иммуногенности вакцинных антигенов за счет расположения их эпитопов на наружной поверхности частиц на равном расстоянии, оптимальном для перекрестного связывания В-клеточными антигенраспознающими рецепторами [3, 20]. Кроме того, размер и форма VLP могут улучшить сбор антигенов миелоидными антигенпрезентирующими клетками и, тем самым, усилить презентацию антигенов Т-лимфоцитам и индукцию полноценного Т-зависимого иммунного ответа [2]. В данной работе исследовалось действие RBD-содержащих химерных VLP на дендритные клетки (ДК) человека — наиболее активные антигенпрезентирующие клетки, которые играют ключевую роль в индукции первичного иммунного ответа [28].

Материалы и методы

Объектом исследования являлись VLP из химерных молекул, состоящих из белка VP1 норовируса геногруппы II генотипа 4 (GII.4), в котором наружный Р-домен был заменен на RBD-содержащий фрагмент белка S коронавируса SARS-CoV-2 (далее — VLP SN-RBD). Для создания VLP из носоглоточного смыва больного коронавирусной инфекцией (Нижегородская область, 2021 г.) с использованием набора РИБО-преп (AmpliSens, Россия) выделяли РНК SARS-CoV-2. Проводили реакцию обратной транскрипции, используя обратную транскриптазу RNAscribe RT и статистические затравки (Биолабмикс, Россия). На матрице полученной кДНК амплифицировали нуклеотидную последовательность, которая кодирует фраг-

мент белка S с 314 по 754 а.о. Этот фрагмент включает RBD и NRP1-связывающий мотив [7, 11]. Для ПЦР использовали праймеры 5'-AAGCCATGGATCAAGCTTCTAACTTTAGAGTCCAACCA-3' и 5'-CATATTGCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGGTGATCACCACA AATGTACATTGTACAATC-3' и Фьюжн ДНК-полимеразу (Pfu-Sso7d), согласно рекомендациям производителя (Биолабмикс, Россия). Полученную кДНК клонировали в составе ранее созданной плазмиды pSN-VP1E30 [1] с использованием рестриктаз Hind III и Xho I (СибЭнзим, Россия). Это приводило к получению генетической конструкции SN-RBD, состоящей из последовательностей, кодирующих домен S и шарнирный регион белка VP1 норовируса, фрагмент белка S коронавируса SARS-CoV-2 и 6 остатков гистидина, слитых в одну молекулу. Экспрессию рекомбинантного белка SN-RBD в клетках *E. coli* штамма Rosetta 2 (DE3), его очистку и ренатурацию с формированием VLP проводили, как описано ранее [1].

Морфологию VLP определяли с помощью электронной микроскопии. Для этого 5 мкл раствора VLP SN-RBD с концентрацией белка 0,1 мг/мл наносили на электронно-микроскопическую медную сетку, покрытую парлодиевой пленкой, отмывали деионизованной водой и окрашивали водным раствором 2% уранилацетата (рН 4,5). Образцы исследовали с помощью электронного микроскопа просвечивающего типа HT7700 (Hitachi, Япония) при рабочем напряжении 80 киловольт.

В качестве контрольного образца (КО) в исследовании использовали лизат бактерий, трансфицированных вектором, не содержащим последовательностей, кодирующих вирусные белки. КО проходил все циклы очистки, согласно протоколу очистки VLP. Таким образом, КО не содержал целевых белков, но мог содержать примеси, которые, теоретически, могли оставаться в пробах VLP после очистки. Перед внесением в клеточные культуры растворы VLP и КО стерилизовали фильтрацией через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Corning, США), диализовали против среды RPMI-1640 и во все пробы вносили 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА, Австрия).

ДК получали из моноцитов *in vitro* традиционным способом [25] с модификациями [29]. Кратко, суть метода состоит в следующем. Мононуклеарные клетки периферической крови здоровых взрослых доноров выделяли центрифугированием над слоем Diacoll-1077 (ДиаМ, Россия), засеивали в 48-луночные планшеты (Costar, США) по $2,5 \times 10^6$ клеток на лунку и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в полной

питательной среде (ППС) следующего состава: среда RPMI-1640 (Gibco, Великобритания) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА, Австрия). Через 2 часа лимфоциты удаляли осторожным пипетированием, а прилипшие моноциты культивировали в ППС с 20 нг/мл интерлейкина-4 (IL-4) и 100 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) (Sci.store.ru, Россия). IL-4 и GM-CSF повторно добавляли в культуры в той же концентрации на 3 день культивирования. На 7 день полученные из моноцитов незрелые ДК переводили в свежую ППС и культивировали с VLP в течение 48 часов при 37°C и 5% CO₂. Конечная концентрация белков VLP в культурах составляла 1, 3 и 10 мкг/мл. Негативными контролями являлись незрелые ДК, инкубированные в ППС без стимуляторов, и ДК, инкубированные с КО в концентрациях, эквивалентных концентрациям VLP. Эквивалентность рассчитывалась по количеству стандартизованной суспензии бактерий-продуцентов, использованной для изготовления VLP и КО. Положительным контролем созревания являлись зрелые ДК (зДК), стимулированные в течение 48 часов коктейлем провоспалительных медиаторов, состоящим из 25 нг/мл IL-6 (Sci.store.ru, Россия), 25 нг/мл IL-1 β , 50 нг/мл фактора некроза опухоли- α (TNF α) (R&D, США) и 1 мкг/мл простагландина E2 (Sigma, США).

После 48 часов инкубации ДК ресуспендировали, собирали из лунок и осаждали центрифугированием. Надосадок собирали, аликвотировали и замораживали при минус 70°C для последующего определения содержания цитокинов IL-6, IL-10 и TNF α с помощью иммуноферментных тест-систем «Интерлейкин-6-ИФА-Бест», «Интерлейкин-10-ИФА-Бест» и «Альфа-ФНО-ИФА-Бест» (Вектор-Бест, Россия). Собранные ДК отмывали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере Дульбекко с 0,09% NaN₃, разделяли на пробы по 50 мкл и окрашивали флуоресцентно меченными моноклональными антителами к молекулам HLA-DR (Сорбент, Россия), CD80 (BioLegend, США), CD83 (Elabscience, КНР) и CD86 (eBioscience, США). Затем клетки отмывали и анализировали на лазерном проточном цитофлуориметре «FacsCalibur» (BD Biosciences, США). ДК гейтировали по профилю прямого и бокового светорассеивания.

При статистическом анализе полученные результаты проверяли на нормальность распределения и, в случае нормального распределения, сравнивали с помощью парного t-теста Стьюдента с поправкой Бонферрони, а в остальных случаях — с помощью теста Вилкоксона с поправкой Бонферрони.

Результаты

В работе использовали VLP из химерных молекул, полученных с помощью экспрессии генетической конструкции SN-RBD в клетках *E. coli*. В эту генетическую конструкцию входили последовательности, кодирующие фрагмент белка VP1 норовируса, который был необходим для сборки частиц, а также фрагмент белка S коронавируса SARS-CoV-2, который включал в себя домен RBD и мотив, связывающий NRP1 (рис. 1А). Клетки-продуценты накапливали рекомбинантный белок в нерастворимом виде в тельцах включения. После выделения телец включения и обработки РНК-азой и ДНК-азой, белки растворяли в денатурирующих условиях, очищали с помощью металл-хелатной хроматографии и удаляли примесь эндотоксинов, как это описано ранее [1]. В результате получали полипептид с молекулярной массой 72 kDa, что соответствует расчетному показателю рекомби-

нантной молекулы (рис. 1Б). Затем проводили ренатурацию полипептидной цепи и получали растворимый химерный белок, который в физиологических условиях спонтанно образовывал полые VLP с формой, близкой к сферической, и размером от 30 до 50 нм (рис. 1В).

Добавление VLP из белка SN-RBD в культуру моноцитарных ДК человека вызывало созревание клеток, которое проявлялось в усилении экспрессии молекул, обеспечивающих презентацию антигенов и ко-стимуляцию Т-лимфоцитов. Цитофлюориметрический анализ показал, что не стимулированные клетки контрольных культур имели типичный фенотип незрелых ДК. Все они экспрессировали молекулу главного комплекса гистосовместимости класса II HLA-DR, $99,0 \pm 0,3\%$ клеток экспрессировало ко-стимулирующую молекулу CD80, и $57,7 \pm 5,7\%$ клеток экспрессировало ко-стимулирующую молекулу CD86. Однако показатели геометрической средней интенсивности

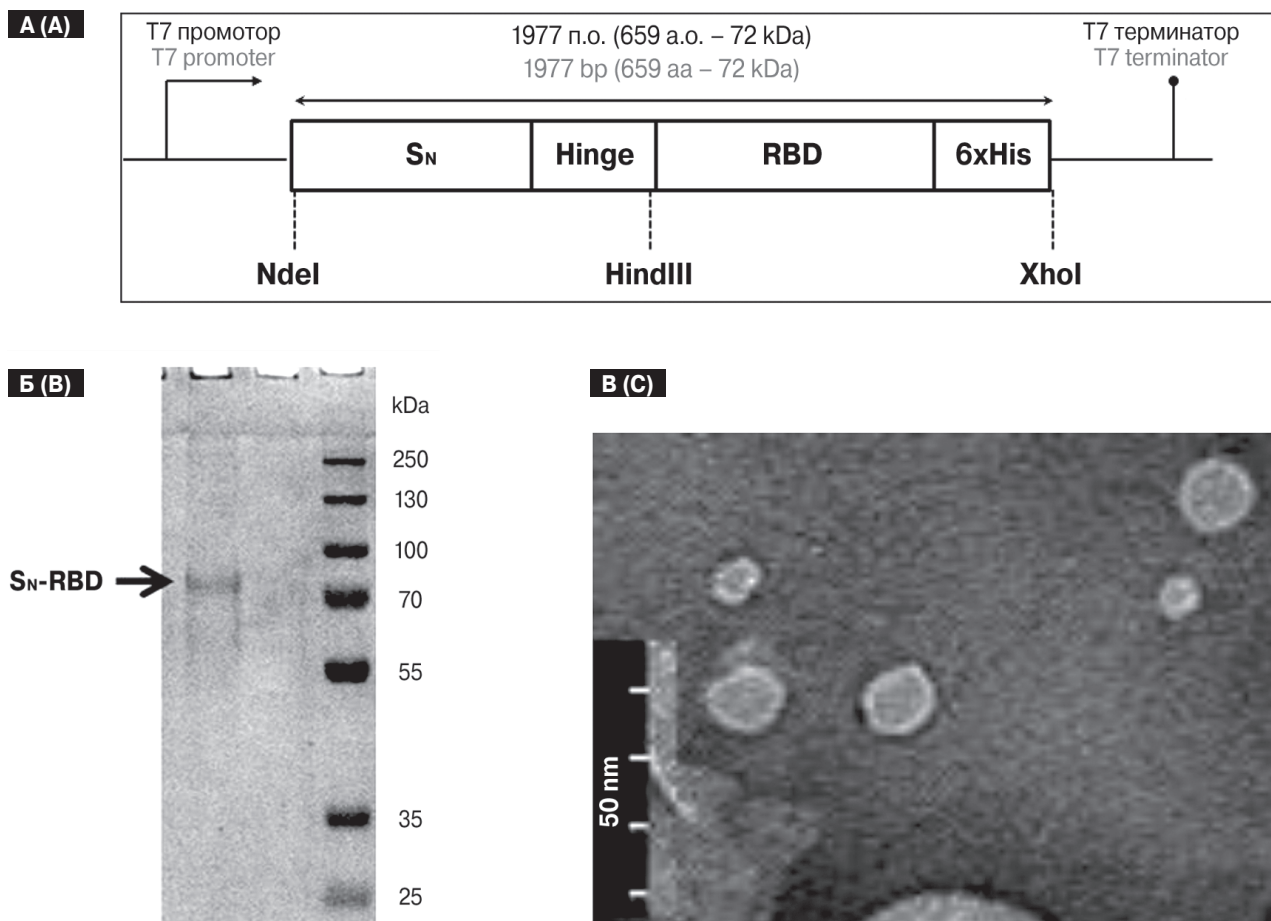


Рисунок 1. Характеристика VLP SN-RBD

Figure 1. Characteristics of SN-RBD VLPs

Примечание. А) Схема генетической конструкции, кодирующей химерный белок SN-RBD. Б) Электрофореграмма очищенного белка SN-RBD. В) Электронно-микроскопические фотографии VLP; увеличение $\times 15\,000$.

Note. А) A scheme of the genetic construct encoding the chimeric protein SN-RBD. Б) Electropherogram of purified SN-RBD protein. С) VLPs electron microscopic images; magnification $\times 15\,000$.

флюоресцентной окраски (GMFI) этих молекул на ДК контрольных культур были низкими, что свидетельствует о малой плотности экспрессии молекул на мембране (рис. 2, 3). Кроме того, клетки контрольных культур обладали слабой экспрессией маркера зрелости ДК — молекулы CD83. Эту молекулу экспрессировало лишь $10,1 \pm 2,1\%$ клеток не стимулированного контроля. Контрольный образец, полученный из бактерий, трансформированных вектором без последовательности SN-RBD, не оказывал существенного влияния на фенотип ДК. В то же время инкубация ДК с VLP SN-RBD вызывала значительный рост экспрессии функционально значимых молекул, который проявляется в увеличении доли клеток, несущих молекулы CD83 и CD86, а также в росте показателя GMFI для молекул HLA-DR, CD80 и CD86 (рис. 2, 3). Увеличение экспрессии этих молекул носило дозозависимый характер, и достоверный рост их экспрессии наблюдался при концентрациях VLP 3 и 10 мкг/мл (рис. 3). Следует отметить, что VLP эффективно стимулировали созревание ДК, и фенотипические показатели клеток, обработанных максимальной использованной концентрацией VLP, приближались к показателям зрелых ДК положительного контроля, созревание которых было индуцировано мощной стимуляцией смесью медиаторов воспаления.

Действие VLP на функциональную активность ДК определяли по продукции клетками цитокинов IL-6, TNF α и IL-10. IL-6 продуцируется дендритными клетками в больших коли-

чествах и является полифункциональным цитокином, способным стимулировать как синтез антител, так и клеточные провоспалительные реакции и созревание Т-хелперов 17 типа. TNF α является прототипическим провоспалительным цитокином, тогда как IL-10 подавляет воспаление и способствует развитию гуморального иммунного ответа. Показано, что инкубация ДК с VLP из SN-RBD многократно усиливала продукцию всех оцененных в работе цитокинов, тогда как не содержащий VLP контрольный образец значимого действия на продукцию цитокинов не оказывал (рис. 4). Для достоверного роста продукции TNF α и IL-10 требовалось добавление в культуру ДК максимальной использованной концентрации VLP 10 мкг/мл, тогда как продукция IL-6 значительно увеличивалась уже при концентрации 3 мкг/мл.

Обсуждение

Объединение белков в наноразмерные строго организованные агрегаты может существенно увеличивать их иммуногенность. Такое объединение может осуществляться за счет свойств самих белков, как это наблюдается у белков вирусных капсидов при самосборке VLP. По-видимому, основной причиной роста иммуногенности белков при их объединении в VLP является оптимизация взаимодействия равномерно повторяющихся антигенных эпитопов поверхности частиц с мембранными иммуноглобулинами В-клеток, которые, во-первых,

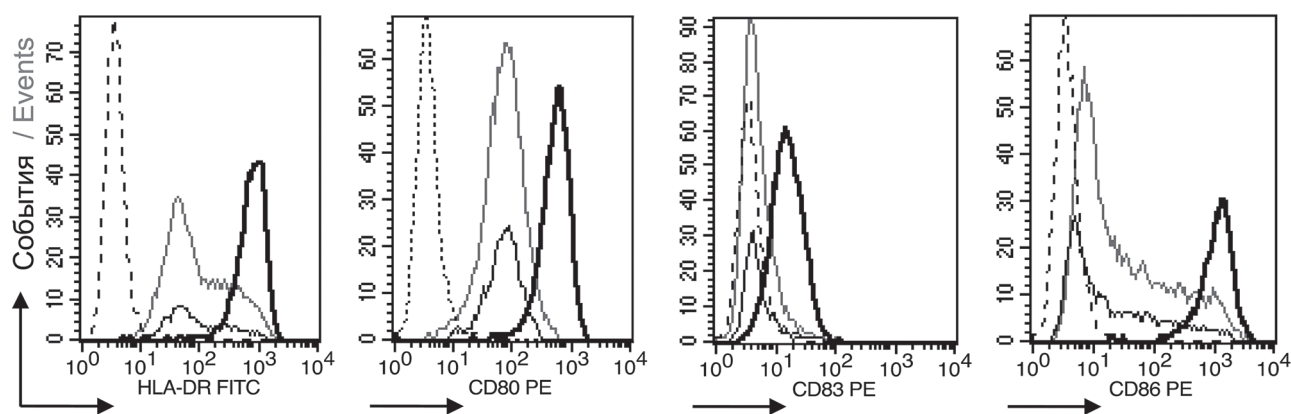


Рисунок 2. Экспрессия мембранных молекул на нестимулированных иДК (тонкая серая линия) и на ДК, инкубированных с 10 мкг/мл VLP SN-RBD (толстая черная линия) или с эквивалентным количеством КО (тонкая черная линия)

Figure 2. Expression of membrane molecules on unstimulated iDCs (thin gray line) and DCs incubated with 10 µg/ml SN-RBD VLPs (thick black line) or equivalent CS amount (thin black line)

Примечание. Пунктирная линия показывает отрицательный контроль окрашивания ДК, инкубированных с VLP. Мембранные молекулы и интенсивность флюоресценции обозначены под осью абсцисс. Представлен результат репрезентативного эксперимента (n = 11).

Note. The dotted line shows DC negative control staining exposed to VLPs. Membrane molecules and fluorescence intensity are indicated below the x-axis. A representative experiment (n = 11) is presented.

являются двухвалентными рецепторами, а вторых, образуют на мембране В-лимфоцита мультимолекулярные кластеры с определенным расстоянием между отдельными рецепторами [3]. Кроме того, свойства поверхности и размер VLP могут способствовать поглощению этих частиц миелоидными антигенпрезентирующими клетками, в частности ДК [2]. Как известно, ДК играют ключевую роль в индукции первичного Т-зависимого иммунного ответа за счет способности обеспечивать мощную стимуляцию Т-лимфоцитов, необходимую для вовлечения наименее зрелых, наивных Т-клеток в иммунный ответ [28]. Жизненный цикл ДК разделен на две фазы. На первой фазе, незрелые ДК, рассеянные по различным тканям организма, собирают доступный антигенный материал. Распознавание типовых молекул микроорганизмов, так называемых патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) а также признаков воспаления и по-

вреждения клеток вызывает созревание ДК. При этом ДК усиливают экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости для презентации собранных антигенов, а также некоторых мембранных молекул и цитокинов, необходимых для дополнительной стимуляции Т-лимфоцитов, изменяют набор хемокиновых рецепторов и мигрируют в Т-клеточную зону дренирующего лимфоидного органа, куда из кровотока постоянно поступают наивные Т-клетки в поиске своего первого контакта с антигеном.

В данной работе показано, что VLP, декорированные фрагментом белка S коронавируса SARS-CoV-2, индуцируют фенотипическое и функциональное созревание ДК человека, которое проявляется в значительном росте экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости и молекул ко-стимуляции Т-лимфоцитов, а также в многократном усилении продукции цитокинов с широким спектром

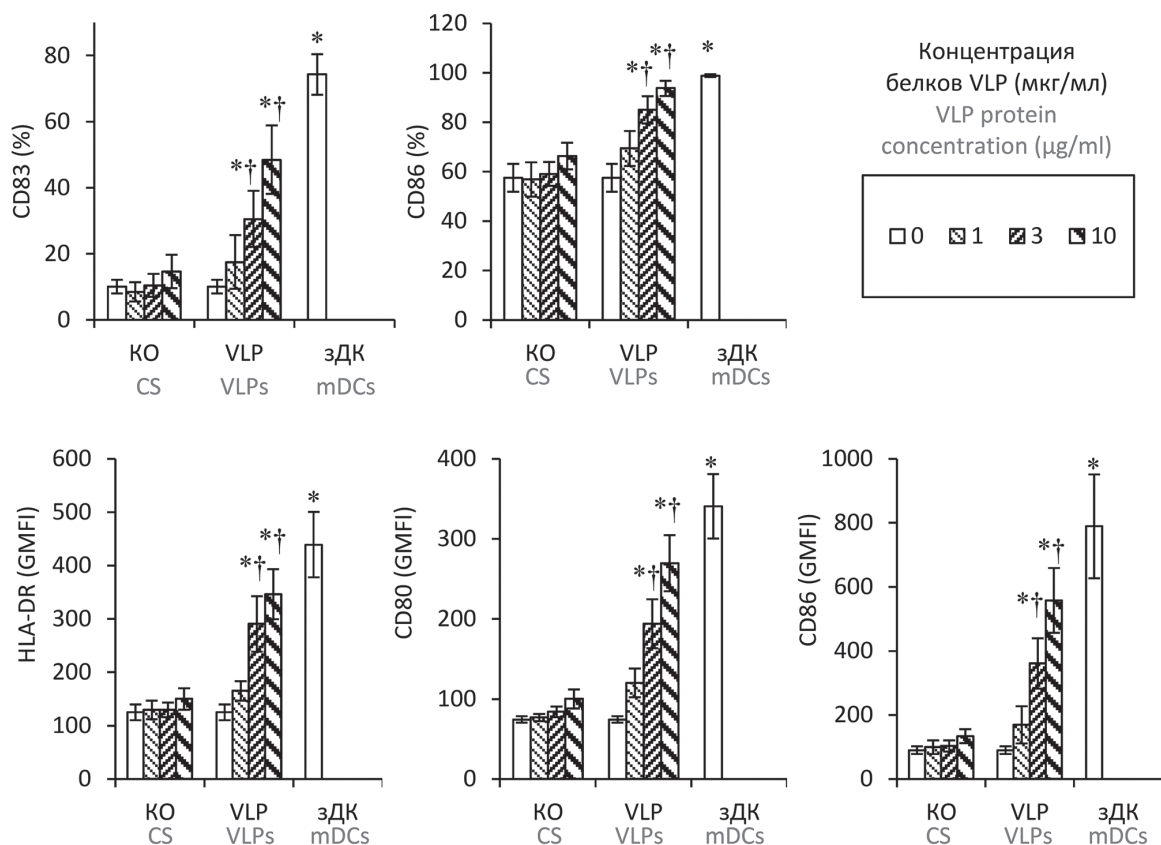


Рисунок 3. Действие VLP SN-RBD на созревание ДК

Figure 3. Effect of SN-RBD VLPs on DC maturation

Примечание. По оси ординат — процент экспрессирующей молекулу клеток или GMFI окрашенной молекулы. Тип стимулятора обозначен под осью абсцисс, концентрация VLP — в легенде. Достоверные отличия ($p < 0,05$ в парном t-тесте с поправкой Бонферрони) при сравнении с нестимулированными ДК (*) и ДК с КО (†). Данные представлены как $M \pm m$ ($n = 11$).

Note. The y-axis: percentage of cells expressing the molecule or the GMFI for stained molecule. The type of stimulant is indicated under the x-axis, the VLP concentration is indicated in the legend. Significant differences ($p < 0.05$ in paired t-test with Bonferroni correction) compared to unstimulated DCs (*) and CS-treated DCs (†). Data are presented as $M \pm m$ ($n = 11$).

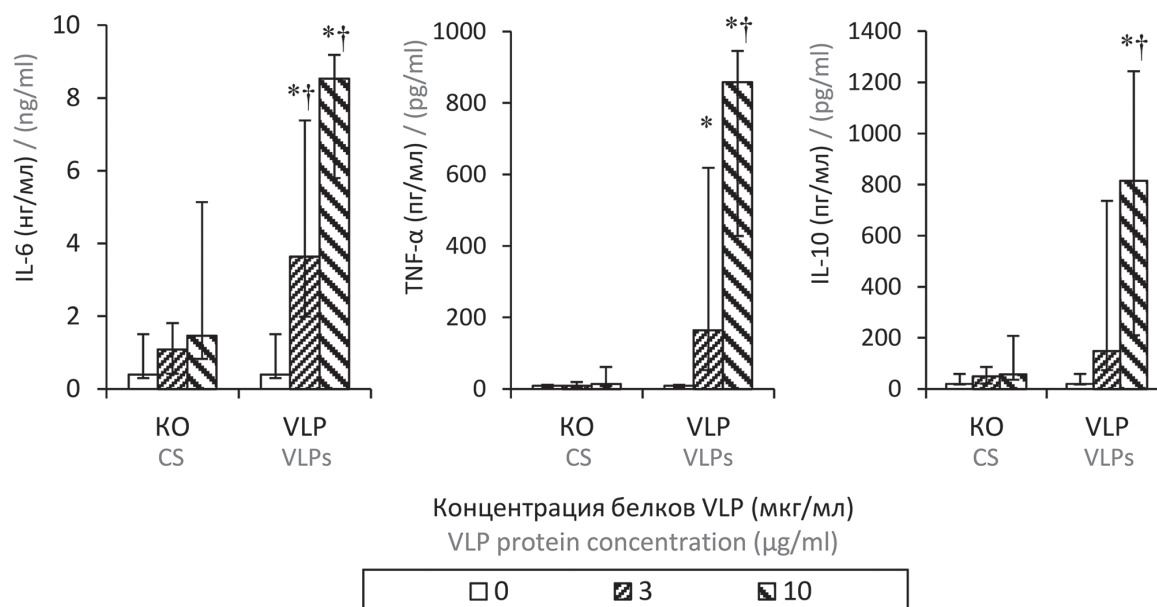


Рисунок 4. Действие VLP SN-RBD на продукцию цитокинов в культурах ДК

Figure 4. Effect of SN-RBD VLPs on cytokine production in DC cultures

Примечание. Тип стимулятора — под осью абсцисс, концентрации цитокинов — по оси ординат, концентрация VLP — в легенде. Достоверные отличия ($p < 0,05$; критерий Вилкоксона с поправкой Бонферрони) при сравнении с нестимулированными ДК (*) и ДК с КО (†). Данные представлены как Медиана \pm квартиль ($n = 11$).

Note. The type of stimulant is under the x-axis, cytokine concentrations are shown on the y-axis, VLP concentration shown in the legend. Significant differences ($p < 0.05$; Wilcoxon test with Bonferroni correction) when compared with unstimulated DCs (*) and DCs cultured with CS (†). Data are presented as Median \pm quartile ($n = 11$).

функций. VLP в максимальной использованной концентрации действуют на ДК очень эффективно и вызывают фенотипические изменения, близкие к показателям зрелых ДК положительного контроля. Столь выраженная стимуляция свидетельствует об успешном распознавании дендритными клетками частиц, покрытых антигенами коронавируса. Ранее было показано, что растворимый белок S и, особенно, его фрагмент RBD вызывают фенотипическое созревание моноцитарных ДК человека, а RBD, к тому же, стимулирует продукцию этими клетками провоспалительных IL-1 β , TNF α и IL-6 [5]. Механизм распознавания белка S или RBD дендритными клетками достоверно не определен, и при его обсуждении вполне ожидаемо высказываются предположения о роли ACE2, который служит коронавирусу в качестве рецептора, критически необходимого для заражения клеток. ACE2 отсутствует на циркулирующих моноцитах и ДК, но сильно экспрессируется на тканевых макрофагах [27]. Полученные *in vitro* моноцитарные ДК слабо экспрессируют ACE2, и доля клеток, несущих этот белок невелика и составляет в среднем 14% от всех незрелых ДК [5]. Следует отметить, что доля ДК, отвечающих на растворимый RBD в предшествующем исследовании [5] или на VLP в данной работе значительно превышает 14%, что может

свидетельствовать либо о непрямом действии на популяцию ДК через отдельные ACE2⁺ клетки, либо о наличии иных механизмов рецепции белка S дендритными клетками. Как известно, основными рецепторами, активирующими созревание ДК, являются PAMP-распознающие Толл-подобные рецепторы (TLR). В связи с этим особый интерес представляют исследования *in silico*, предсказывающие возможность распознавания белка S с помощью TLR4 [9]. Кроме того, расчеты *in silico* предсказывают, что RBD может связываться с высокой аффинностью с множеством других мембранных рецепторов различных групп ДК, включая CD26, CD2, CD56, CD7, CCR9, CD150, CD4, CD50/ICAM3 и XCR1 [19]. Также можно предположить, что ДК при взаимодействии с VLP могут распознавать NRP1-связывающий мотив коронавирусного белка S. Рецептор NRP1 обладает широким профилем экспрессии, необычайным разнообразием функций и множеством лигандов, отвечающих «правилу С-конца» (CendR: С-концевая последовательность Arg/LisXXArg/Lis, где X — любой а.о.) [35]. В состав его лигандов входят изоформа фактора роста эндотелия сосудов VEGF-A165, трансформирующий фактор роста β , семафорин 3А и множество продуктов частичного ферментативного расщепления белков, включая субъединицу S1 коронавируса [7,

11, 31]. NRP1 под названием BDCA4 известен как маркер плазмацитоидных ДК, он отсутствует на моноцитах, но сильно экспрессируется на всех ДК, полученных из моноцитов *in vitro* [6, 10, 32]. NRP1 на ДК работает как классический рецептор комплемента, обеспечивая взаимодействие этих клеток с объектами, «помеченными» факторами C4d, C3d и iC3b [6]. Кроме того, NRP1 стимулирует миграцию ДК, влияя через плексин-A1 на цитоскелет клеток и увеличивая их пластичность [10]. С высокой вероятностью можно предположить, что ДК используют NRP1 для эндоцитоза белков и пептидов, отвечающих правилу CendR. По крайней мере, опухолевые клетки поглощают такие лиганды посредством NRP1-зависимого эндоцитозного процесса, напоминающего макропиноцитоз [21].

Таким образом можно предположить, что RBD, представленный на VLP, имеет возможность взаимодействовать как с ACE2, так и с мно-

жеством других мембранных молекул ДК, для части которых показана способность передачи активационного сигнала внутрь клетки. Также можно предположить, что NRP1-связывающий мотив после частичного расщепления последовательности белка S может увеличивать эффективность поглощения частиц, а также влиять на миграцию ДК.

Заключение

Показано, что химерные норовирусные VLP, декорированные RBD-содержащим фрагментом белка S коронавируса SARS-CoV-2, эффективно индуцируют фенотипическое и функциональное созревание ДК. По нашему мнению, полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования химерных норовирусных VLP для экспонирования белка S коронавируса SARS-CoV-2.

Список литературы/References

- Новиков Д.В., Мелентьев Д.А., Мохонов В.В., Кашников А.Ю., Новикова Н.А., Лапин В.А., Мохорова Е.В., Новиков В.В. Получение вирусоподобных частиц норовируса (Caliciviridae: Norovirus), содержащих белок VP1 энтеровируса Echovirus 30 (Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B) // Вопросы вирусологии. 2021. Т. 66, № 5. С. 383–389. [Novikov D.V., Melentev D.A., Mokhonov V.V., Kashnikov A.Y., Novikova N.A., Lapin V.A., Mokhonova E.V., Novikov V.V. Construction of norovirus (Caliciviridae: Norovirus) virus-like particles containing VP1 of the Echovirus 30 (Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B). *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2021, vol. 66, no. 5, pp. 383–389. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-79
- Талаев В.Ю., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н., Светлова М.В., Воронина Е.В. Пути эндоцитоза вирусоподобных частиц и презентация поглощенных антигенов // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 219–233. [Talayev V.Yu., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N., Svetlova M.V., Voronina E.V. Virus-like particle endocytosis pathways and presentation of captured antigens. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 219–233. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-VPE-8045
- Талаев В.Ю., Светлова М.В., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н., Воронина Е.В., Чистяков С.И. Взаимодействие В-клеточных рецепторов и антигенов с различным пространственным расположением // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 5. С. 809–821. [Talayev V.Yu., Svetlova M.V., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N., Voronina E.V., Chistyakov S.I. Interaction of B-cell receptors and antigens with different spatial arrangement. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 5, pp. 809–821. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-EOB-14033
- Baric R.S., Yount B., Lindesmith L., Harrington P.R., Greene S.R., Tseng F.C., Davis N., Johnston R.E., Klapper D.G., Moe C.L. Expression and self-assembly of Norwalk virus capsid protein from venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J. Virol.*, 2002, vol. 76, no. 6, pp. 3023–3030. doi: 10.1128/jvi.76.6.3023-3030.2002
- Barreda D., Santiago C., Rodríguez J.R., Rodríguez J.F., Casasnovas J.M., Mérida I., Ávila-Flores A. SARS-CoV-2 Spike Protein and Its Receptor Binding Domain Promote a Proinflammatory Activation Profile on Human Dendritic Cells. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 12: 3279. doi: 10.3390/cells10123279
- Battin C., De Sousa Linhares A., Paster W., Isenman D.E., Wahrman M., Leitner J., Zlabinger G.J., Steinberger P., Hofer J. Neuropilin-1 Acts as a Receptor for Complement Split Products. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 10: 2209. doi: 10.3389/fimmu.2019.02209
- Cantuti-Castelvetri L., Ojha R., Pedro L.D., Djannatian M., Franz J., Kuivanen S., van der Meer F., Kallio K., Kaya T., Anastasina M., Smura T., Levanov L., Szivoczka L., Tobi A., Kallio-Kokko H., Österlund P., Joensuu M., Meunier F.A., Butcher S.J., Winkler M.S., Mollenhauer B., Helenius A., Gokce O., Teesalu T., Hepojoki J., Vapalahti O., Stadelmann C., Balistreri G., Simons M. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science*, 2020, vol. 370, no. 6518, pp. 856–860. doi: 10.1126/science.abd2985
- Chen R., Neill J.D., Noel J.S., Hutson A.M., Glass R.I., Estes M.K., Prasad B.V. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, no. 12, pp. 6469–6479. doi: 10.1128/JVI.78.12.6469-6479.2004
- Choudhury A., Mukherjee S. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 10, pp. 2105–2113. doi: 10.1002/jmv.25987
- Curreli S., Wong B.S., Latinovic O., Konstantopoulos K., Stamatou N.M. Class 3 semaphorins induce F-actin reorganization in human dendritic cells: Role in cell migration. *J. Leukoc. Biol.*, 2016, vol. 100, no. 6, pp. 1323–1334. doi: 10.1189/jlb.2A1114-534R

11. Daly J.L., Simonetti B., Klein K., Chen K.E., Williamson M.K., Antón-Plágaro C., Shoemark D.K., Simón-Gracia L., Bauer M., Hollandi R., Greber U.F., Horvath P., Sessions R.B., Helenius A., Hiscox J.A., Teesalu T., Matthews D.A., Davidson A.D., Collins B.M., Cullen P.J., Yamauchi Y. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science*, 2020, vol. 370, no. 6518, pp. 861–865. doi: 10.1126/science.abd3072
12. Hardy M.E. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, vol. 253, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.femsle.2005.08.031
13. Herbst-Kralovetz M., Mason H.S., Chen Q. Norwalk virus-like particles as vaccines. *Expert Rev. Vaccines*, 2010, vol. 9, no. 3, pp. 299–307. doi: 10.1586/erv.09.163
14. Jiang X., Wang M., Graham D.Y., Estes M.K. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.*, 1992, vol. 66, no. 11, pp. 6527–6532. doi: 10.1128/JVI.66.11.6527-6532.1992
15. Letko M., Marzi A., Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.*, 2020, vol. 5, no. 4, pp. 562–569. doi: 10.1038/s41564-020-0688-y
16. Li F. Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: a decade of structural studies. *J. Virol.*, 2015, vol. 89, no. 4, pp. 1954–1964. doi: 10.1128/JVI.02615-14
17. Logunov D.Y., Dolzhenkova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyreshina 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
18. Malik Y.A. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays. J. Pathol.*, 2020, vol. 42, no. 1, pp. 3–11.
19. Mobini S., Chizari M., Mafakher L., Rismani E., Rismani E. Structure-based study of immune receptors as eligible binding targets of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein. *J. Mol. Graph. Model.*, 2021, vol. 108: 107997. doi: 10.1016/j.jmgm.2021.107997
20. Mohsen M.O., Gomes A.C., Vogel M., Bachmann M.F. Interaction of viral capsid-derived virus-like particles (VLPs) with the innate immune system. *Vaccines*, 2018, vol. 6, no 3, pp. 37. doi: 10.3390/vaccines6030037
21. Pang H.B., Braun G.B., Friman T., Aza-Blanc P., Ruidiaz M.E., Sugahara K.N., Teesalu T., Ruoslahti E. An endocytosis pathway initiated through neuropilin-1 and regulated by nutrient availability. *Nat. Commun.*, 2014, vol. 5: 4904. doi: 10.1038/ncomms5904
22. Prasad B.V., Hardy M.E., Dokland T., Bella J., Rossmann M.G., Estes M.K. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, 1999, vol. 286, pp. 287–290. doi: 10.1126/science.286.5438.287
23. Prasad B.V., Rothnagel R., Jiang X., Estes M.K. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J. Virol.*, 1994, vol. 68, pp. 5117–5125. doi: 10.1128/jvi.68.8.5117-5125.1994
24. Rando H.M., Lordan R., Lee A.J., Naik A., Wellhausen N., Sell E., Kolla L., COVID-19 Review Consortium, Gitter A., Greene C.S. Application of Traditional Vaccine Development Strategies to SARS-CoV-2. *mSystems*, 2023, vol. 8, no. 2: e0092722. doi: 10.1128/msystems.00927-22
25. Sallusto F., Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.*, 1994, vol. 179, pp. 1109–1118. doi: 10.1084/jem.179.4.1109
26. Santi L., Batchelor L., Huang Z., Hjelm B., Kilbourne J., Arntzen C.J., Chen Q., Mason H.S. An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. *Vaccine*, 2008, vol. 26, no. 15, pp. 1846–1854. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.01.053
27. Song X., Hu W., Yu H., Zhao L., Zhao Y., Zhao X., Xue H.H., Zhao Y. Little to no expression of angiotensin-converting enzyme-2 on most human peripheral blood immune cells but highly expressed on tissue macrophages. *Cytometry A*, 2023, vol. 103, no. 2, pp. 136–145. doi: 10.1002/cyto.a.24285
28. Steinman R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, pp. 271–296. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001415
29. Talayev V., Zaichenko I., Svetlova M., Matveichev A., Babaykina O., Voronina E., Mironov A. Low-dose influenza vaccine Grippol Quadrivalent with adjuvant Polyoxidonium induces a T helper-2 mediated humoral immune response and increases NK cell activity. *Vaccine*, 2020, vol. 38, no. 42, pp. 6645–6655. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.07.053
30. Tan M., Jiang X. The p-domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J. Virol.*, 2005, vol. 79, pp. 14017–14030. doi: 10.1128/JVI.79.22.14017-14030.2005
31. Teesalu T., Sugahara K.N., Kotamraju V.R., Ruoslahti E. C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, no. 38, pp. 16157–16162. doi: 10.1073/pnas.0908201106
32. Tordjman R., Lepelletier Y., Lemarchandel V., Cambot M., Gaulard P., Hermine O., Roméo P.H. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat. Immunol.*, 2002, vol. 3, no. 5, pp. 477–482. doi: 10.1038/ni789
33. Tortorici M.A., Vesler D. Structural insights into coronavirus entry. *Adv. Virus. Res.*, 2019, vol. 105, pp. 93–116. doi: 10.1016/bs.aivir.2019.08.002
34. Tulimilli S.V., Dallavalasa S., Basavaraju C.G., Kumar Rao V., Chikkahonnaiah P., Madhunapantula S.V., Veeranna R.P. Variants of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Vaccine Effectiveness. *Vaccines (Basel)*, 2022, vol. 10, no. 10: 1751. doi: 10.3390/vaccines10101751
35. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Vesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 2020, vol. 181, no. 2, pp. 281–292.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058
36. Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P., Meng J., Zhu Z., Zhang Z., Wang J., Sheng J., Quan L., Xia Z., Tan W., Cheng G., Jiang T. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*, 2020, vol. 27, no. 3, pp. 325–328. doi: 10.1016/j.chom.2020.02.001

37. Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y., Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 2020, vol. 367, no. 6485, pp. 1444–1448. doi: 10.1126/science.abb2762
38. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.R., Zhu Y., Li B., Huang C.L., Chen H.D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.D., Liu M.Q., Chen Y., Shen X.R., Wang X., Zheng X.S., Zhao K., Chen Q.J., Deng F., Liu L.L., Yan B., Zhan F.X., Wang Y.Y., Xiao G.F., Shi Z.L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020, vol. 579, no. 7798, pp. 270–273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7

Авторы:

Талаев В.Ю., д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Новиков Д.В., к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Заиченко И.Е., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Светлова М.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Воронина Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Бабайкина О.Н., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Лапин В.А., младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Мелентьев Д.А., младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Новикова Н.А., д.б.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Кашников А.Ю., научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Новиков В.В., д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммунохимии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Talayev V.Yu., DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Novikov D.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Zaichenko I.Ye., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Svetlova M.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Voronina E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Babaykina O.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Lapin V.A., Junior Researcher, Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Melentiev D.A., Junior Researcher, Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Novikova N.A., DSc (Biology), Professor, Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Kashnikov A.Yu., Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Novikov V.V., DSc (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТА «КОРОНАДЕРМ-PS» ДЛЯ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2

Т.В. Савин^{1,2}, В.В. Копать³, А.А. Рябченкова³, Е.Л. Чирак³, Е.Р. Чирак³, А.И. Саенко³,
И.В. Духовлинов³, Г.М. Сысоева⁴, С.Г. Гамалей⁴, Г.Г. Шими́на⁴, О.С. Таранов⁵,
Е.Д. Даниленко⁴, А.С. Симбирцев^{1,2}, А.А. Тотолян^{1,2}

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

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

³ ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

⁴ Институт медицинской биотехнологии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁵ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово,
Новосибирская область, Россия

Резюме. Новая коронавирусная инфекция, вызванная SARS-CoV-2 приводит к формированию как гуморального, так и клеточного иммунного ответа к различным антигенам вируса. Оценка иммунитета к SARS-CoV-2 в основном проводится в рутинной практике путем определения специфических иммуноглобулинов. Однако сильная изменчивость структуры S-белка SARS-CoV-2 у новых геновариантов и отсутствие корреляции специфических антител и CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов приводят к ложноотрицательным ответам, а массовая оценка клеточного иммунитета затруднена в связи со сложностью технологии ELISPOT и цитофлюориметрии. С целью решения данной проблемы был разработан диагностический способ оценки клеточного иммунного ответа к SARS-CoV-2, в основе которого лежит постановка кожной пробы с последующей оценкой реакции гиперчувствительности замедленного типа с участием специфических Т-лимфоцитов памяти. Основу препарата «КоронаДерм-PS» составляет Cord_PS, представляющий собой гибридный рекомбинантный белок, состоящий из участков структурных белков S, M, N, E коронавируса SARS-CoV-2. Специфическая активность данного химерного антигена была исследована в тесте активации Т-лимфоцитов в культуре, оцененной по способности продуцировать интерферон гамма при анализе методом цитофлюориметрии.

Адрес для переписки:

Савин Тихон Валерьевич
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 911 288-39-74.
E-mail: savin@pasteurorg.ru

Contacts:

Tikhon V. Savin
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 911 288-39-74.
E-mail: savin@pasteurorg.ru

Для цитирования:

Савин Т.В., Копать В.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р.,
Саенко А.И., Духовлинов И.В., Сысоева Г.М., Гамалей С.Г., Шими́на Г.Г.,
Таранов О.С., Даниленко Е.Д., Симбирцев А.С., Тотолян А.А.
Экспериментальное исследование специфической иммунологической
активности и безопасности препарата «КоронаДерм-PS» для оценки
клеточного иммунитета против коронавируса SARS-CoV-2 // Инфекция
и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 238–250. doi: 10.15789/2220-7619-
ESO-17661

Citation:

Savin T.V., Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R.,
Saenko A.I., Dukhovlinov I.V., Sysoeva G.M., Gamaley S.G., Shimina G.G.,
Taranov O.S., Danilenko E.D., Simbirtsev A.S., Totolian A.A. Experimentally
investigated “CoronaDerm-PS”-driven SARS-CoV-2-specific cellular
immunity and safety // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 238–250. doi: 10.15789/2220-7619-
ESO-17661

Для оценки специфических иммунологических свойств данного химерного антигена было проведено доклиническое исследование безопасности препарата «КоронаДерм-PS» у экспериментальных животных. В ходе проведенного исследования были получены данные об отсутствии иммунотоксических, анафилактических, токсических и раздражающих свойств при исследовании препарата у мышей и морских свинок. В экспериментах по изучению специфической активности препарата были получены данные о дозозависимом развитии кожной реакции у 90–100% морских свинок, вакцинированных препаратами «ЭпиВакКорона», «КовиВак», «Гам-КОВИД-Вак», что подтверждает возможность определения поствакцинального клеточного иммунитета с помощью данного теста. При этом, наличие в рекомбинантном химерном полипептиде функционально активных Т-клеточных антигенных эпитопов позволяет оценить ответ на соответствующий природный коронавирусный белок, что показано на примере ответа на вакцины «Гам-КОВИД-Вак» (пример ответа на S-белок) и «ЭпиВакКорона» (пример ответа на N-белок). Таким образом, перспективным применением кожного теста с использованием препарата «КоронаДерм-PS» может быть массовый, быстрый, не требующий специального оборудования скрининг для оценки специфического клеточного иммунитета в популяции. К его преимуществам относятся простота анализа, высокая специфичность и чувствительность. Окончательное решение о практическом применении теста будет принято после проведения планируемых клинических испытаний безопасности и эффективности.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, коронавирусный антиген Cord_PS, CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, IFN γ , Т-клеточный иммунный ответ.

EXPERIMENTALLY INVESTIGATED “CORONADERM-PS”-DRIVEN SARS-CoV-2-SPECIFIC CELLULAR IMMUNITY AND SAFETY

Savin T.V.^{a,b}, Kopat V.V.^c, Riabchenkova A.A.^c, Chirak E.L.^c, Chirak E.R.^c, Saenko A.I.^c, Dukhovlinov I.V.^c, Sysoeva G.M.^d, Gamaley S.G.^d, Shimina G.G.^d, Taranov O.S.^e, Danilenko E.D.^d, Simbirtsev A.S.^{a,b}, Totolian A.A.^{a,b}

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

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

^c LLC “ATG Service-Gene”, St. Petersburg, Russian Federation

^d Institute of Medical Biotechnology of the State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of the Rospotrebnadzor, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

^e State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of the Rospotrebnadzor, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. Novel coronavirus disease 2019, caused by the SARS-CoV-2, initiate humoral and cellular immune responses against diverse virus antigens. The assessment of SARS-CoV-2-specific is mainly carried out in routine practice by determining specific immunoglobulins. However, high variability in S-protein structure in new genovariants of SARS-CoV-2 virus and the lack of correlation between specific antibodies and CD8⁺ T-lymphocytes underlie false negative responses, and mass assessment of cellular immunity is complicated due to the complexity of applying ELISPOT and cytofluorometry techniques. To solve this issue, a diagnostic method was developed for assessing SARS-CoV-2-specific cellular immune response, which is based on a skin test followed by evaluating a delayed-type hypersensitivity reaction involving antigen-specific memory T-lymphocytes. A diagnostic preparation CoronaDerm-PS is based on Cord_PS, which is a hybrid recombinant protein consisting of parts of the SARS-CoV-2 structural proteins S, M, N, E. The specific activity of this chimeric antigen was analyzed in cultured T-lymphocyte activation test by assessing interferon- γ production using cytofluorometry. To investigate the chimeric antigen specific activity, a preclinical safety study with CoronaDerm-PS preparation in experimental animals was conducted. A dose-dependent developing skin reaction was observed in 90–100% of guinea pigs vaccinated by EpiVacCorona, CoviVac, Gam-COVID-Vac, which confirms a potential for assessing post-vaccination cellular immunity using CoronaDerm-PS preparation. Upon this, the presence of functionally active T-cell-antigenic epitopes in the recombinant polypeptide allows to evaluate SARS-CoV-2-specific response illustrated by detected response after Gam-COVID-Vac (S-protein) and EpiVacCorona (N-protein) vaccination. Thus, a skin test based on CoronaDerm-PS preparation may be a promising diagnostic tool for rapid mass screening requiring no specialized laboratory equipment for assessing populational SARS-CoV-2-specific immunity. Such a test is distinguished by advantages such as ease of analysis, high specificity and sensitivity. The final decision-making on using this test in a real-world practice may achieved after conducting further clinical safety and effectiveness trials.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, coronavirus antigen Cord_PS, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, IFN γ , T cell immune response.

Введение

Инфицирование SARS-CoV-2 приводит к сероконверсии с формированием антител против различных антигенов коронавируса. В то же время клеточный иммунный ответ связан с образованием вирус-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, длительное время сохраняющихся в лимфоидных органах в виде клеток памяти [10, 20]. CD8⁺ Т-лимфоциты распознают чужеродные вирусные антигены в ассоциации с молекулами гистосовместимости I класса и убивают клетки, инфицированные вирусами. CD4⁺ Т-лимфоциты хелперы распознают вирусные антигены, процессированные и представленные на антиген-представляющих клетках (главным образом профессиональных антиген-представляющих дендритных клетках) в ассоциации с молекулами гистосовместимости II класса и выполняют роль помощников в синтезе В-лимфоцитами специфических противовирусных антител.

В настоящее время диагностика коронавирусной инфекции в основном связана с определением противовирусных антител [2]. Наличие нейтрализующих антител против S-белка, является главным коррелятом протективного иммунного ответа при развитии COVID-19 и после вакцинации [11, 16]. Недостатком такого подхода является сильная изменчивость структуры S-белка у новых штаммов коронавируса, что приводит к ложноотрицательным ответам. Кроме того, применяемый массово тест на антитела IgM и IgG не позволяет сделать однозначный вывод о том, сформировался ли иммунитет у человека, достаточный для защиты от повторного заражения.

Проблемой оценки клеточного иммунитета является использование сложных и дорогостоящих иммунологических технологий с помощью ELISPOT и цитофлюориметрии, которые применяются только в специализированных научно-исследовательских лабораториях [1, 6] и не могут быть использованы для массовой диагностики.

В качестве решения этой проблемы нами был разработан простой, быстрый и не требующий специального оборудования диагностический способ оценки клеточного иммунного ответа против SARS-CoV-2, получивший название «КоронаДерм-PS». Предложенный нами метод заключается в постановке кожной пробы с разработанным препаратом на основе рекомбинантного гибридного белка, содержащего антигенные участки последовательности белков коронавируса (Евразийская заявка «Способ оценки клеточного иммунного ответа против коронавирусной инфекции» номер 202190517 и и положительное решение по Международной

заявка «Express diagnosticum for SARS-COV-2», номер PCT/IB2020/058162). Наблюдаемая местная кожная воспалительная реакция является результатом развития гиперчувствительности замедленного типа, связанной с активацией *in vivo* Т-лимфоцитов, специфичных к антигенам коронавируса, и проявляется в виде эритемы и уплотнения (папулы) в месте введения в течение 72 часов, при наличии в организме Т-клеточного иммунного ответа против SARS-CoV-2. Проверенные временем аналоги — проба Манту, Диаскинтест для диагностики туберкулеза и некоторые другие кожные тесты для диагностики инфекционных заболеваний.

Основу препарата «КоронаДерм-PS» составляет коронавирусный антиген Cord_PS, представляющий собой гибридный рекомбинантный белок, состоящий из участков структурных белков S, M, N, E коронавируса SARS-CoV-2 [4]. Специфическая активность созданного химерного антигена была исследована в тесте активации Т-лимфоцитов в культуре, оцененной по способности продуцировать интерферон гамма при анализе методом цитофлюориметрии [5].

Целью настоящего исследования стало изучение специфических иммунологических свойств химерного антигена, разработка способа оценки Т-клеточного противовирусного иммунитета при постановке кожного теста у экспериментальных животных, доклинические исследования безопасности препарата «КоронаДерм-PS».

Материалы и методы

Изучение специфической активности препарата «КоронаДерм-PS» в тесте реакции гиперчувствительности «замедленного» типа на морских свинках проведена в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1, 2», М., 2012, включала изучение специфической активности препарата «КоронаДерм-PS» в тесте реакции гиперчувствительности «замедленного» типа на морских свинках; токсичности препарата при однократном и многократном подкожном введении на двух видах животных, мышах и морских свинках; местно-раздражающего действия при одно- и многократном введении на мышах и морских свинках; иммунотоксических свойств на мышах; алергизирующих свойств на морских свинках; мутагенного действия в тесте Эймса *in vitro* и на мышах, в тесте учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга; влияния на органы репродуктивной системы на морских свинках. Исследование проведено в ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

(Новосибирск) и в Научно-исследовательском институте фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга (НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга) ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (г. Томск).

Исследуемый препарат. Для оценки специфической активности использовали разработанный гибридный антиген «КоронаДерм-PS». Препарат представляет собой гибридный рекомбинантный белок, продуцируемый генетически модифицированной культурой клеток *Escherichia coli*, состоящий из участков структурных белков S, M, N, E коронавируса SARS-CoV-2, разведенный в стерильном изотоническом Tris-HCl буферном растворе с консервантом (фенол). Концентрация белка составляла 1 мг/мл.

В качестве контрольного препарата был использован растворитель следующего состава: буфер Tris-HCl — 25 мМ, рН 8,0, натрия хлорид, фенол, вода для инъекций — до 0,2 мл.

Метод оценки специфической активности. Исследование проводилось в соответствии с методическими рекомендациями «Медицинские иммунобиологические препараты. Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов. Санитарные правила» (СП 3.3.2.561-96-МИБП). Исследования проведены на морских свинках, самцах и самках, массой 350–400 г (возраст 6–7 недель), полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» ФГУП Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (РФЮ Ленинградская обл., д. Рапполово). Для сенсibilизации морских свинок препарат «КоронаДерм-PS» вводили однократно внутрикожно в подушечки лап в смеси с равным объемом полного адьюванта Фрейнда. Сенсibilизирующие дозы препарата составляли 10 и 50 мкг/животное, объем смеси для введения — 100 мкл/животное. Контрольным свинкам вводили растворитель в полном адьюванте Фрейнда в том же объеме. Постановку кожных проб осуществляли спустя 14 суток после сенсibilизирующих инъекций внутрикожным введением препарата в дозах 5–50 мкг/животное в объеме 50 мкл. Во второй серии экспериментов дозы антигена «КоронаДерм-PS» для сенсibilизации морских свинок составляли 10, 25, 50 и 75 мкг/животное. Постановку кожных проб осуществляли на 21 сутки после сенсibilизирующих инъекций внутрикожным введением препарата в дозах 10, 25, 50 и 75 мкг/животное в объеме 50 мкл.

Исследование специфической активности препарата «КоронаДерм-PS» также проведено на животных, вакцинированных против коро-

навируса SARS-CoV-2 следующими вакцинными препаратами:

1) «ЭпиВакКорона». Вакцина на основе пептидных антигенов для профилактики COVID-19, суспензия для внутримышечного введения, 0,5 мл/доза, серия В03–12.20 (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирской области).

2) «Гам-КОВИД-Вак». Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2. Компонент I, серия 380721, компонент II, серия 320721 (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва).

3) «КовиВак». Вакцина коронавирусная инактивированная цельновирионная концентрированная очищенная, суспензия для внутримышечного введения, 0,5 мл/доза, серия 015 (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Москва).

Исследования проведены на морских свинках, самцах и самках, массой 350–400 г (возраст 7–8 недель), полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово Новосибирской области). Для исследования формировали 9 групп животных по 10–17 особей в каждой. Морских свинок опытных групп иммунизировали внутримышечно в дозе, равной вакцинирующей для человека, перечисленными вакцинами: 1 группа — «ЭпиВакКорона», ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск (двукратно с интервалом 21 сутки), 2 группа — «Гам-КОВИД-Вак», ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва (две инъекции с интервалом в 21 сутки), 3 группа — «КовиВак», ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Москва, (двукратно с интервалом 14 суток). Через 21 сутки («ЭпиВакКорона»), 31 сутки («КовиВак») и 60 суток («Гам-КОВИД-Вак») после второй инъекции вакцины проводили тестирование внутрикожным введением «КоронаДерм-PS» (1 мг/мл, 50 мкл/животное, 3 разведения (10, 25, 50 мкг) в разные точки). Сроки тестирования определены на основании предварительных экспериментальных данных. Наличие местной реакции — покраснения (гиперемия) и образования воспалительного инфильтрата или некроза в месте внутрикожного введения регистрировали через 72–96 ч после введения.

Полученные в ходе исследования данные обрабатывались методом вариационной статистики. Различия между экспериментальными группами при нормальном распределении определяли с помощью критерия Тьюки, при несоответствии распределения нормальному — с помощью критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (p) принимали равным 0,05.

Метод оценки иммунотоксического действия препарата. Препарат «КоронаДерм-PS» вводили подкожно однократно в дозе 10 мкг в объеме 0,2 мл на мышь. Контрольным животным в те же сроки вводили физиологический раствор. Экспериментальные группы формировали методом случайной выборки, в каждой группе было по 8–10 особей. Оценку состояния иммунной системы проводили через 1 и 21 сутки после введения препарата, используя в качестве показателей вес и клеточность лимфоидных органов; функциональную активность фагоцитов (перитонеальные макрофаги) с использованием НСТ-теста [17]; число антителообразующих клеток (АОК) селезенки, титры гемагглютининов [3, 13].

Метод оценки общей анафилаксии. Исследование проводилось на морских свинках в соответствии с Методическими рекомендациями по оценке алергизирующих свойств лекарственных средств [8]. Сенсибилизацию морских свинок в эксперименте препаратом «КоронаДерм-PS» осуществляли в дозе 0,32 мкг/400 г (0,8 мкг/кг), что соответствует дозе, рекомендуемой для человека, пересчитанной на морскую свинку с учетом разницы в площади поверхности тела. Препарат разводили физиологическим раствором и вводили в объеме 0,2 мл/животное: первый раз подкожно, второй и третий — внутримышечно, через день, в область бедра. Контрольным животным вводили физиологический раствор в аналогичном объеме по той же схеме. Анафилактогенные свойства препарата выявляли путем внутрисердечного введения субстанции препарата на 14 сутки после последней сенсибилизирующей инъекции. Доза субстанции, использованная для тестирования, была равна трехкратной сенсибилизирующей дозе — 0,96 мкг/животное (2,4 мкг/кг) в объеме 0,3 мл.

Результаты

Результаты кожного теста гиперчувствительности «замедленного» типа определяли наличием местной реакции — покраснения (эритема) и образования воспалительного инфильтрата в месте внутрикожного введения по 5-балльной системе [7]. Реакцию кожи учитывали визуально через 72 часа после введения и оценивали в баллах по следующей шкале:

- 0 — видимой реакции нет;
- 1 — бледно-розовая эритема по всему участку или по его периферии;
- 2 — ярко-розовая эритема по всему участку или его периферии;
- 3 — красная эритема по всему участку;
- 4 — инфильтрация и отек кожи (утолщение кожной складки) при наличии или отсутствии эритемы;

5 — эритема, выраженная инфильтрация, очаговые изъязвления (некроз), возможны геморрагии, образование корочек.

Помимо этого, результаты кожной реакции в те же сроки оценивали путем измерения двух поперечных размеров области гиперемии и инфильтрата (папулы) в миллиметрах прозрачной линейкой. Гиперемию учитывали только в случае отсутствия инфильтрата. Ответная реакция считалась:

- отрицательной — при полном отсутствии инфильтрата и гиперемии;
- сомнительной — при наличии гиперемии без инфильтрата;
- положительной — при наличии инфильтрата (папулы) любого размера.

Результаты оценки кожной реакции у морских свинок, сенсибилизированных препаратом «КоронаДерм-PS», по 5-балльной шкале представлены в табл. 1.

Полученные данные свидетельствуют о том, что внутрикожное введение препарата в дозе 5 мкг/животное морским свинкам, сенсибилизированным белком в дозе 10 мкг, вызывает слабо выраженную кожную реакцию. Увеличение разрешающей дозы до 10 мкг/свинку приводит к развитию умеренно выраженной кожной реакции (1,88–3,35 балла). Формирование дозозависимой кожной реакции наблюдали у животных, сенсибилизированных более высокой дозой препарата (50 мкг/животное). Внутрикожное введение разрешающих доз препарата (10 и 50 мкг) контрольным несенсибилизированным морским свинкам не вызывало развития кожной реакции.

Результаты количественной оценки кожной реакции, вызванной препаратом «КоронаДерм-PS», по диаметру инфильтратов представлены в табл. 2.

Результаты второй серии экспериментов тестирования морских свинок, сенсибилизированных препаратом «КоронаДерм-PS» в дозах от 10 до 75 мкг, свидетельствуют о том, что внутрикожное введение препарата в дозе 10 мкг, вызывает слабо выраженную кожную реакцию у 1–2 животных из 7 в группе (табл. 3). Увеличение сенсибилизирующей дозы до 25 мкг/свинку приводит к развитию умеренно выраженной кожной реакции у 86% животных при использовании разрешающей дозы 10 мкг/животное и у 100% при введении препарата в дозах 25–75 мкг/животное. Выраженность кожной реакции возрастала с увеличением разрешающей дозы препарата (табл. 3).

Согласно полученным данным, внутрикожное введение препарата «КоронаДерм-PS» в дозах 10, 25, 50, 75 мкг морским свинкам, сенсибилизированным этим же препаратом в полном адьюванте Фрейнда в дозах 50 и 75 мкг/

животное, вызывает развитие кожной реакции у 100% морских свинок, в отличие от несенсибилизированного контроля. Размер инфильтратов статистически значимо увеличивался при увеличении разрешающей дозы препарата. Сравнение показателей частоты кожной реакции и величины инфильтратов (гиперемии) у животных, сенсибилизированных разными дозами белка, свидетельствует о наличии дозо-

вой зависимости реакции от величины сенсибилизирующей дозы в диапазоне от 10 до 50 мкг при разрешении всеми использованными дозами (10–75 мкг). Увеличение сенсибилизирующей дозы до 75 мкг дальнейшего усиления реакции на введение разрешающих доз препарата не вызывало (см. табл. 3). Таким образом, рекомбинантный антиген «КоронаДерм-PS» вызывает дозозависимое развитие кожной ре-

Таблица 1. Показатели кожной реакции (баллы) у морских свинок, сенсибилизированных субстанцией препарата «КоронаДерм-PS» серии 002 в полном адъюванте Фрейнда, через 72 часа после внутрикожного введения разрешающей дозы

Table 1. Indicators of skin reaction (score) in guinea pigs sensitized with “CoronaDerm-PS” series 002 in Freund’s complete adjuvant, 72 hours after intradermally administered resolving dose

№ животного No. animal	СД = 10 мкг/м.свинку, в/к SD = 10 µg/guinea pig, intracutaneous		СД = 50 мкг/м.свинку, в/к SD = 50 µg/guinea pig, intracutaneous	
	РД = 5 мкг, в/к RD = 5 µg, intracutaneous	РД = 10 мкг, в/к RD = 10 µg, intracutaneous	РД = 25 мкг, в/к RD = 25 µg, intracutaneous	РД = 50 мкг, в/к RD = 50 µg, intracutaneous
1	0	0	4	4
2	0	0	4	4
3	0	1	4	4
4	4	4	4	4
5	1	4	1	1
6	0	1	1	4
7	0	4	1	4
8	0	1		
M±m	0,63±0,50	1,88±0,64	2,71±0,61	3,57±0,43
p	0,1058*		0,5594**	

Примечание. СД — сенсибилизирующая доза; РД — разрешающая доза; в/к — внутрикожно; * — статистически значимых отличий групп животных, которым вводили РД 5 мкг и 10 мкг не выявлено. ** — статистически значимых отличий групп животных, которым вводили РД 25 мкг и 50 мкг не выявлено (U-критерий Манна–Уитни).

Note. SD — sensitizing dose; RD — resolving dose; * — No significant differences between groups of animals administered with RD 5 µg and 10 µg. ** — No significant differences between groups of animals administered with RD 25 µg and 50 µg (Mann-Whitney U test).

Таблица 2. Диаметры кожных инфильтратов (мм) у морских свинок, сенсибилизированных субстанцией препарата «КоронаДерм-PS» в полном адъюванте Фрейнда, через 72 часа после внутрикожного введения разрешающей дозы

Table 2. Skin infiltrate diameter (mm) in guinea pigs sensitized with “CoronaDerm-PS” in complete Freund’s adjuvant, 72 hours after intradermally administered resolving dose

№ животного No. animal	СД = 10 мкг/м.свинку, в/к SD = 10 µg/guinea pig, intracutaneous		СД = 50 мкг/м.свинку, в/к SD = 50 µg/guinea pig, intracutaneous	
	РД = 10 мкг, в/к RD = 10 µg, intracutaneous	РД = 25 мкг, в/к RD = 25 µg, intracutaneous	РД = 10 мкг, в/к RD = 10 µg, intracutaneous	РД = 25 мкг, в/к RD = 25 µg, intracutaneous
1	5,5 (Иф +Гп) (I+H)	10 Иф (I)	6,5 Иф (I)	10 (Иф +Гп) (I+H)
2	7 Иф (I)	9,5 Иф (I)	5 Иф (I)	5 Иф (I)
3	4,5 Иф (I)	7,5 Иф (I)	6 Иф (I)	7,5 Иф (I)
4	5,5 (Иф +Гп) (I+H)	8 (Иф +Гп) (I+H)	0	6 Иф (I)
5	5 Иф (I)	9,5 Иф (I)	6 Иф (I)	8,5 Иф (I)
6	2 Иф (I)	7,5 Иф (I)	5 (Иф+Гп) (I+H)	9 (Иф+Гп) (I+H)
M±m	4,92±0,68	8,67±0,46*	5,70±0,30	7,67±0,77**

Примечание. СД — сенсибилизирующая доза; РД — разрешающая доза; Иф — инфильтрат; Гп — гиперемия; в/к — внутрикожно; * — статистически значимое отличие по сравнению с группой животных, которым вводили СД 10 мкг и РД 10 мкг (p < 0,009); ** — статистически значимое отличие по сравнению с опытной группой животных, которым вводили СД 50 мкг и РД 10 мкг (p < 0,009).

Note. SD — sensitizing dose; RD — resolving dose, I — infiltrate, H — hyperemia; * — significant difference compared to group of animals administered with SD 10 µg and RD 10 µg (p < 0.009); ** — significant difference compared to experimental group of animals administered with SD 50 mcg and RD 10 µg (p < 0.009).

Таблица 3. Показатели кожной реакции у морских свинок, сенсibilизированных препаратом «КоронаДерм-PS» в полном адьюванте Фрейнда, через 72 часа после внутрикожного введения разрешающей дозы препарата

Table 3. Magnitude of skin reaction in guinea pigs sensitized with “CoronaDerm-PS” in Freund’s complete adjuvant, 72 hours after intradermally administered resolving dose

СД, мкг/ животное SD, µg/guinea pig	Показатели Parameter	Разрешающая доза, мкг/животное Resolving dose, µg/guinea pig			
		10	25	50	75
10	Размер кожной реакции, мм Skin reaction size, mm (M±m)	0,64	0,64	0,86	2,57
	Количество животных с положительной реакцией Number of animals with a positive reaction, %	14%	14%	14%	28%
25	Размер кожной реакции, мм Skin reaction size, mm (M±m)	3,1±0,8	4,4±0,9	5,9±1,2*	6,0±0,8*
	Количество животных с положительной реакцией, % Number of animals with a positive reaction, %	86%	86%	86%	86%
50	Размер кожной реакции, мм Skin reaction size, mm (M±m)	4,7±0,8	6,4±0,9	8,1±0,8*	9,0±0,6*,**
	Количество животных с положительной реакцией, % Number of animals with a positive reaction, %	100%	100%	100%	100%
75	Размер кожной реакции, мм Skin reaction size, mm (M±m)	4,5±0,3	5,9±0,6	7,5±0,6*,**	9,1±0,5*,**,***
	Количество животных с положительной реакцией, % Number of animals with a positive reaction, %	100%	100%	100%	100%

Примечание. СД — сенсibilизирующая доза; M±m — среднее значение и ошибка средней; * — статистически значимое отличие по сравнению с группой животных, которым вводили препарат в разрешающей дозе 10 мкг/животное; ** — статистически значимое отличие по сравнению с группой животных, которым вводили препарат в разрешающей дозе 25 мкг/животное; *** — статистически значимое отличие по сравнению с группой животных, которым вводили препарат в разрешающей дозе 50 мкг/животное.

Note. SD — sensitizing dose; M±m — mean and standard error; * — significant difference compared to group of animals administered with preparation resolving dose of 10 µg/animal; ** — significant difference compared to group of animals administered with preparation resolving dose of 25 µg/animal; *** — significant difference compared to group of animals administered with preparation resolving dose of 50 µg/animal.

Таблица 4. Показатели кожной реакции у морских свинок, вакцинированных препаратами «ЭпиВакКорона», «Гам-КОВИД-Вак» и «КовиВак», через 72 часа после внутрикожного введения разрешающего введения различных доз препарата «КоронаДерм-PS»

Table 4. Magnitude of skin reaction in guinea pigs vaccinated with EpiVacCorona, Gam-COVID-Vac and CoviVac, 72 hours after intradermally administered varying “CoronaDerm-PS” resolving doses

Вакцины Vaccine	Показатели Value	Разрешающая доза, мкг/животное Resolving dose, µg/guinea pig		
		10	25	50
ЭпиВакКорона EpiVacCorona	Размер кожной реакции, мм Skin reaction size, mm (M±m)	3,6±1,0	3,9±0,4	6,7±0,7
	Количество животных с положительной реакцией, % Number of animals with a positive reaction, %	40%	70%	90%
Гам-КОВИД-Вак Gam-COVID-Vac	Размер кожной реакции, мм Skin reaction size, mm (M±m)	2,8±0,8	3,9±0,6	3,5±0,4
	Количество животных с положительной реакцией, % Number of animals with a positive reaction, %	40%	80%	90%
КовиВак CoviVac	Размер кожной реакции, мм Skin reaction size, mm (M±m)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	5,5±0,5
	Количество животных с положительной реакцией, % Number of animals with a positive reaction, %	н.д. n.d.	н.д. n.d.	100%

Примечание. M±m — среднее значение и ошибка средней; н.д. — с данной дозой исследование не делалось.

Note. M±m — mean and standard error; n.d. — preparation dose not examined.

Таблица 5. Влияние лекарственного препарата «КоронаДерм-PS» (КоронаСкинТест) на массу и клеточность лимфоидных органов мышей линии Balb/c через 1 и 21 сутки после однократного подкожного введения

Table 5. The effect of "CoronaDerm-PS" (CoronaSkinTest) on Balb/c mouse lymphoid organs weight and cellularity 1 and 21 days after a single subcutaneous administration

Исследуемые показатели Value	Группы экспериментальных животных/Group	
	Контроль (физ. раствор) Control group (0.9% NaCl) n = 8	«КоронаДерм-PS», 10 мкг/0,2 мл/мышь "CoronaDerm-PS", 10 µg/0.2 ml/mice n = 8
Через 1 сутки после введения/1 day after administration		
Масса мышей, г Weight of mice, g	19,4±0,3	20,2±0,4
Весовые индексы селезенки, × 10, мг/г Weight indices of the spleen, × 10, mg/g	100,6±3,7	105,1±4,9
Абсолютное количество ЯСК селезенки, × 10 ⁶ /орган Absolute number of spleen nucleus containing cells, × 10 ⁶ /organ	180,6±18,0	178,8±10,0
Весовые индексы тимуса, × 10, мг/г Thymus weight indices, × 10, mg/g	30,3±1,9	31,5±1,5
Абсолютное количество тимоцитов, × 10 ⁶ /орган Absolute number of thymocytes, × 10 ⁶ /organ	80,7±7,0	75,1±6,8
Через 21 сутки после введения/21 days after administration		
Масса мышей, г Weight of mice, g	22,0±0,4	23,2±0,3*
Весовые индексы селезенки, × 10, мг/г Weight indices of the spleen, × 10, mg/g	88,3±3,0	98,7±3,7*
Абсолютное количество ЯСК селезенки, × 10 ⁶ /орган Absolute number of spleen nucleus containing cells, × 10 ⁶ /organ	333,6±19,7	333,0±16,3*
Весовые индексы тимуса, × 10, мг/г Thymus weight indices, × 10, mg/g	27,5±1,9	28,6±2,0
Абсолютное количество тимоцитов, × 10 ⁶ /орган Absolute number of thymocytes, × 10 ⁶ /organ	85,4±7,6	97,0±3,0*

Примечание. Данные представлены как среднее значение±ошибка среднего (M±m); n — число животных в группе, * — статистически значимое отличие по сравнению с группой животных, которым вводили физиологический раствор, p < 0,05.

Note. Data are presented as mean±error of mean (M±m); n — number of animals in the group, * — significant difference compared to group of animals inoculated with 0.9%NaCl, p < 0.05.

Таблица 6. Показатели функциональной активности перитонеальных макрофагов мышей линии Balb/c после однократного подкожного введения лекарственного препарата «КоронаДерм-PS» (КоронаСкинТест)

Table 6. Functional activity of Balb/c mouse peritoneal macrophages after a single "CoronaDerm-PS" (CoronaSkinTest) subcutaneous inoculation

Препарат, доза Drug, dose	Число макрофагов в мл, × 10 ⁶ Number of macrophages per ml, × 10 ⁶	Уровень восстановленного НСТ, о.е. × 100 Level of recovered NBT, p.u. × 100
Через 1 сутки после введения/1 day after administration		
Контроль (физ.раствор) (n = 6) Control group (0.9% NaCl) (n = 6)	4,9±0,2	7,9±0,07
КоронаДерм-PS, 10 мкг/0,2 мл/мышь (n = 6) CoronaDerm-PS, 10 µg/0.2 ml/mice (n = 6)	3,7±0,3*	8,0±0,06
Через 21 сутки после введения/21 days after administration		
Контроль (физ.раствор) (n = 6) Control group (0.9% NaCl) (n = 6)	6,6±0,9	13,4±0,01
КоронаДерм-PS, 10 мкг/0,2 мл/мышь (n = 6) CoronaDerm-PS, 10 µg/0.2 ml/mice (n = 6)	6,1±0,4	13,9±0,01

Примечание. Данные представлены как среднее значение±ошибка среднего (M±m); n — число животных в группе, * — статистически значимое отличие по сравнению с группой животных, которым вводили физиологический раствор, p < 0,05.

Note. Data are presented as mean±error of mean (M±m); n — number of animals in the group, * — significant difference compared to group of animals inoculated with 0.9%NaCl, p < 0.05.

акции у сенсibilизированных данным антигеном морских свинок, являющейся проявлением реакции гиперчувствительности «замедленного» типа.

В табл. 4 представлены результаты количественной оценки кожной реакции, вызванной препаратом «КоронаДерм-PS», у морских свинок после их вакцинации препаратами «ЭпиВакКорона», «Гам-КОВИД-Вак» и «КовиВак».

Введение препарата «КоронаДерм-PS» (от 05.2021) в дозе 10 мкг/животное на 21 сутки после двукратной иммунизации вакциной «ЭпиВакКорона» вызывало развитие кожной реакции лишь у 40% вакцинированных животных. Повышение дозы препарата до 25 мкг/животное приводило к появлению инфильтратов у 70% морских свинок. «КоронаДерм-PS» в дозе 50 мкг/животное вызывал выраженную кожную реакцию у 90% морских свинок, при этом средний диаметр инфильтратов в этой группе в 1,7–1,9 раза превышал показатели животных, которым вводили препарат в меньших дозах. При исследовании кожной реакции при использовании вакцины «Гам-КОВИД-Вак» оказалось, что введение препарата «КоронаДерм-PS» в дозе 10 мкг на животное вызывало развитие кожной реакции у 40% морских свинок. Повышение дозы до 50 мкг/свинку приводило к увеличению количества животных с положительной реакцией до 90% и среднего диаметра инфильтрата — до $3,5 \pm 0,4$ мм. Тестирование морских свинок, вакцинированных препаратом «КовиВак» при разрешающей дозе «КоронаДерм-PS» 50 мкг/животное на 31 сутки после второй инъекции показало наличие выраженной кожной реакции (средний диаметр инфильтрата $5,50 \pm 0,47$ мм) у 100% животных.

Таким образом, результаты экспериментального исследования свидетельствуют о развитии дозозависимой кожной реакции на введение препарата «КоронаДерм-PS» у морских свинок, вакцинированных препаратами «Гам-КОВИД-Вак», «ЭпиВакКорона» и «КовиВак», что подтверждает факт развития клеточного иммунного ответа на вакцинацию.

Результаты исследования иммунотоксичности, представленные в таблице 5, свидетельствуют о том, что весовые индексы и клеточность лимфоидных органов животных опытной группы через 1 сутки после введения препарата «КоронаДерм-PS» достоверно не отличались от контрольных. Однократное подкожное введение препарата в дозе 10 мкг через 21 сутки после введения приводило к повышению весовых индексов лимфоидных органов и числа спленцитов и тимоцитов в группе, которой вводили препарат.

Исследуемый препарат не вызывал изменения показателей окислительно-восстановительной

активности фагоцитов, индуцированной опсонизированными эритроцитами барана (табл. 6).

В ходе проведенного исследования не получено данных, которые свидетельствовали бы об иммунотоксических свойствах лекарственного препарата «КоронаДерм-PS» (КоронаСкинТест). Препарат не приводил к снижению веса и клеточности лимфоидных органов, ингибированию функции фагоцитов, изменениям показателей гуморального иммунного ответа мышей.

Учет интенсивности анафилактической реакции был проведен по методу Weigle [12] с наблюдением за состоянием животных в течение двух часов с момента введения разрешающей дозы препарата.

Признаки анафилактической реакции:

+ — кратковременное почесывание носа, взъерошивание шерсти;

++ — четко выраженные частые почесывания носа, единичные чихания;

+++ — спастический кашель (несколько приступов), боковое положение животного, отделение кала и мочи;

++++ — спазм дыхательных путей, конвульсивные прыжки, судороги, гибель животного (как правило, на 5-й минуте).

Результаты оценки анафилактогенных свойств препарата «КоронаДерм-PS» в тесте общей анафилаксии на морских свинках, сенсibilизированных препаратом в дозе, рекомендованной для человека, пересчитанной на морскую свинку с учетом разницы в площади поверхности тела, свидетельствуют об отсутствии у препарата «КоронаДерм-PS» в использованной дозе анафилактогенной активности.

Препарат «КоронаДерм-PS» при однократном (в дозе 0,5–1,0 мл/животное) и многократном (в дозе 0,2 мл/животное ежедневно в течение 10 дней) подкожном введении мышам и морским свинкам не проявлял местнораздражающего действия.

Исследование общей токсичности показало, что препарат «КоронаДерм-PS» при однократном подкожном введении в дозе 0,5 мл/мышь (25 мкг белка на мышь) не вызывал гибели животных, не оказывал токсического влияния на массу тела и ее прирост, показатели периферической крови и костного мозга, массу и морфологию внутренних органов мышей. При однократном подкожном введении в дозе 1,0 мл/животное (50 мкг белка на животное) морским свинкам обоего пола препарат также не приводил к гибели животных или появлению признаков интоксикации, не оказывал токсического влияния на массу тела и ее прирост, гематологические показатели крови, костномозговое кроветворение, массу и морфологию внутренних органов морских свинок.

В ходе изучения хронической токсичности показано, что при десятикратном подкожном введении в дозе 10 мкг/0,2 мл/мышь препарат «КоронаДерм-PS» не вызывал гибели животных, клинических признаков отравления, не влиял на массу и температуру тела, гематологические показатели периферической крови, костномозговое кроветворение, не оказывал токсического действия на биохимические показатели крови, массу и морфологию внутренних органов мышей. При десятикратном подкожном введении в дозе 10 мкг/0,2 мл/животное не приводил к гибели морских свинок обоего пола, появлению признаков интоксикации, не оказывал токсического влияния на массу и температуру тела, показатели периферической крови и костномозгового кроветворения, маркерные биохимические показатели, отражающие состояние основных видов обмена, функциональное состояние печени и почек, массу и морфологию внутренних органов морских свинок.

Изучение мутагенного действия препарата «КоронаДерм-PS» в тесте учета хромосомных aberrаций показало, что препарат «КоронаДерм-PS» в условиях однократного введения в дозе, рекомендуемой к применению у человека (10 мкг белка/0,2 мл/мышь), а также при 4-кратном введении в той же дозе не приводил к статистически значимому увеличению количества хромосомных aberrаций в клетках костного мозга самцов и самок мышей. Препарат «КоронаДерм-PS» в диапазоне тестируемых концентраций (от 51 мкг/мл до 0,0051 мкг/мл) не вызывал индукции мутаций по типу сдвига рамки считывания и замены пар оснований и, следовательно, не оказывал мутагенного действия на индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* в тесте Эймса. Данные, полученные в системе *in vitro*, с использованием тестерных штаммов *Salmonella typhimurium*, а также *in vivo*, в тесте учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей, свидетельствуют об отсутствии у препарата «КоронаДерм-PS» мутагенной активности.

В экспериментах на морских свинках при одно- и десятикратном введении не обнаружено токсического воздействия препарата «КоронаДерм-PS» на структуру половых желез, что позволяет предполагать отсутствие у препарата генеративной токсичности.

Обсуждение

В настоящем исследовании показано, что введение животным рекомбинантного химерного коронавирусного антигена «КоронаДерм-PS» приводит к формированию Т-клеточного иммунного ответа, что подтверждается формированием кожной реакции гиперчувствитель-

ности «замедленного» типа при внутрикожном введении разрешающей дозы данного антигена. В экспериментах по изучению специфической активности препарата «КоронаДерм-PS» установлено, что он вызывает дозозависимое развитие кожной реакции у 90–100% морских свинок, вакцинированных препаратами «ЭпиВакКорона», «КовиВак» и «Гам-КОВИД-Вак» спустя 21–60 суток после последнего введения вакцин, что подтверждает возможность определения с помощью данного теста наличия поствакцинального клеточного иммунитета. Доля прореагировавших животных и интенсивность кожной реакции зависели от дозы препарата и типа вакцины.

Важно, что использованные в проведенных экспериментах вакцины содержали разные коронавирусные белки в качестве антигенов. Вакцина «Гам-КОВИД-Вак» представлена S-белком, а вакцина «ЭпиВакКорона» — в основном N-белком SARS-CoV-2. При этом в обоих случаях вакцинации этими препаратами введение разрешающей дозы рекомбинантного антигена приводило к Т-клеточному ответу с развитием гиперчувствительности «замедленного» типа. Это доказывает наличие в рекомбинантном химерном полипептиде функционально активных Т-клеточных антигенных эпитопов, позволяющих оценить ответ на соответствующий природный коронавирусный белок. Это означает, что созданный рекомбинантный антиген позволяет оценить поствакцинальный иммунитет у лиц вакцинированных основными типами современных вакцин против коронавируса SARS-CoV-2. В то же время наличие выраженной кожной реакции у морских свинок, вакцинированных цельновирионной вакциной «КовиВак», которую с определенными ограничениями можно рассматривать как модель инфекционного процесса, позволяет говорить о возможности использования «КоронаДерм-PS» для выявления постинфекционного клеточного ответа у переболевших COVID-19.

Одним из главных вопросов иммунологии коронавирусной инфекции состоит в том, как долго сохраняется высокий протективный иммунный ответ после перенесенного заболевания, какова динамика ответа и насколько продолжителен Т-клеточный и гуморальный противовирусный иммунитет.

Несмотря на общую лимфопению, специфичные к коронавирусу CD4⁺ Т-лимфоциты появляются в периферической крови больных COVID-19 уже на 2–4 сутки после начала клинических симптомов, и их раннее обнаружение коррелирует с более быстрым освобождением от коронавируса и более легким клиническим течением [19]. После выздоровления, в целом,

Т-клеточный иммунитет коррелировал с уровнями IgG-антител против N- и S-белков и сохранялся долго после завершения клинической симптоматики, тогда как титры антител падали намного раньше [1]. По другим данным, специфические к коронавирусу SARS-CoV-2 CD4⁺, CD8⁺ Т-лимфоциты, В-лимфоциты и антитела длительно сохранялись у больных после первичной инфекции, но все эти показатели имели разную кинетику. IgG против S-белка сохранялись на высоком уровне после 6 месяцев наблюдения, хотя уровень специфических к S-белку В-лимфоцитов памяти снижался. Специфические к SARS-CoV-2 CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты имели период полужизни от 3 до 5 месяцев [14].

После инфицирования коронавирусом SARS-CoV у реконвалесцентов происходит образование вирус-специфических CD4⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих IL-2, IFN γ , TNF, видимо относящихся к клонам Th 1 типа, и CD8⁺ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ и TNF. Сильный Т-клеточный ответ коррелировал с высокими титрами нейтрализующих антител [18]. При COVID-19 большинство выздоровевших пациентов в течение 3 месяцев имели детектируемые уровни специфических к SARS-CoV-2 CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. У значительной доли пациентов эти клетки при стимуляции S-белком либо N белком коронавируса синтезировали TNF и IFN γ . Количество специфических к SARS-CoV-2 CD4⁺ Т-лимфоцитов коррелировало с титрами IgG-антител против RBD S-белка и против N белка, однако не обнаружено корреляции между титрами этих антител и уровнем CD8⁺ Т-лимфоцитов [15]. Хотя бы с одним коронавирусным антигеном реагировали Т-лимфоциты 14 из 33 (42,4%) доноров и 85 из 87 (97,7%) переболевших COVID-19 пациентов, ответ сохранялся до 12 месяцев. Между Т-клеточным ответом на S-белок и нейтрализующими антителами обнаружена лишь слабая положительная корреляция, более того, Т-клеточный ответ на SARS-CoV-2 обнаружен у 8 из 9 (88,9%) переболевших COVID-19 с отсутствием нейтрализующих антител [12].

В работе Bilich и соавт. [9] показано, что у переболевших COVID-19 пациентов уровни противовирусных антител достаточно быстро падают, тогда как Т-клеточный ответ сохраняется значительно дольше, по крайней мере 6 месяцев. В связи с этим можно предполагать большую эффективность вакцин, направленных на индукцию именно Т-клеточного ответа. Результаты приведенных исследований свидетельствуют о разной динамике формирования и продолжительности защитного Т-клеточного и В-клеточного противовирусного иммунитета при коронавирусной инфекции и подтверждают важность проведения массовых популяционных исследований этих показателей.

Оценка Т-клеточного иммунного ответа, наряду с определением вируснейтрализующих антител, позволяет не только охарактеризовать иммунный ответ пациента, но и прогнозировать иммунную защищенность к повторным инфекциям или после вакцинации. Кожный тест с использованием препарата «КоронаДерм-PS» может быть использован для массовой, быстрой, не требующей специального оборудования оценки специфического клеточного иммунитета в популяции. К его преимуществам относятся простота анализа, высокая специфичность и чувствительность. Окончательное решение о практическом применении теста будет принято после проведения планируемых клинических испытаний безопасности и эффективности.

Таким образом, разработанный рекомбинантный антиген продемонстрировал специфическую активность при оценке Т-клеточного противовирусного иммунитета с помощью постановки кожного теста, а также были получены данные об отсутствии мутагенного действия, токсичности и анафилактичности у лабораторных животных.

В перспективе, основным предназначением предлагаемого способа — диагностика наличия клеточного иммунного ответа к коронавирусу SARS-CoV-2 как после перенесенного заболевания, в том числе без клинических симптомов, так и после проведенной вакцинации.

Список литературы/References

1. Герасимова В.В., Колесник С.В., Кудлай Д.А., Гольдерова А.С. Оценка иммунного ответа SARS-COV-2-специфических Т-клеток методом ELISPOT // *Acta Biomedica Scientifica*. 2022. Т. 7. № 5–2. С. 96–102. [Gerasimova V.V., Kolesnik S.V., Kudlay D.A., Golderova A.S. ELISPOT assay of the SARS-CoV-2 specific T cells immune response. *Acta Biomedica Scientifica*, 2022, vol. 7, no. 5–2, pp. 96–102. (In Russ.)] doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-2.10
2. 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

3. Иммунологические методы. Под ред. Г. Фримель. М.: Медицина, 1987, 472 с. [Frimel G. Immunological methods. *Moscow: Meditsina, 1987, 472 p. (In Russ.)*]
4. Копать В.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р., Саенко А.И., Колмаков Н.Н., Симбирцев А.С., Духовлинов И.В., Тотолян А.А. Разработка структуры и штамма-продуцента *E. coli* для антигена, содержащего последовательности белков N, S, М, Е коронавируса SARS-CoV-2 // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 653–662. [Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Kolmakov N.N., Simbirtsev A.S., Dukhovlinov I.V., Totolian A.A. Designing structure and *E. coli* strain-producer bearing SARS-CoV-2 N, S, M, E proteinrelated sequence antigen. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 653–662. (In Russ.)* doi: 10.15789/2220-7619-DSA-15624
5. Копать В.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р., Саенко А.И., Кудрявцев И.В., Трулев А.С., Савин Т.В., Зуева Е.В., Симбирцев А.С., Тотолян А.А., Духовлинов И.В. Разработка технологии очистки, биохимическая и иммунологическая характеристика рекомбинантного химерного антигена для оценки Т-клеточного иммунитета против коронавирусной инфекции // Медицинская иммунология. 2024. Т. 26, № 3. С. 591–606. [Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Kudryavtsev I.V., Trulioff A.S., Savin T.V., Zueva E.V., Simbirtsev A.S., Totolian A.A., Dukhovlinov I.V. Purification technology design, biochemical and immunological characteristics of the recombinant chimeric antigen for evaluation of T cell immunity against coronavirus infection. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2024, vol. 26, no. 3, pp. 591–606. (In Russ.)* doi: 10.15789/1563-0625-PTD-2942
6. Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Тотолян Арег А. Т-хелперы и их клетки-мишени при COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 409–426. [Kudryavtsev I.V., Golovkin A.S., Totolian Areg A. T helper cell subsets and related target cells in acute COVID-19. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 409–426. (In Russ.)* doi: 10.15789/2220-7619-THC-1882
7. Оценка алергизирующих свойств фармакологических средств: Методические рекомендации № 98/300 (утв. Минздравом РФ 04.12.1998) [Assessment of allergic properties of pharmacological agents: methodological recommendations No. 98/300 (approved by the Ministry of Health of the Russian Federation on 04.12.1998) (In Russ.)]
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [Guidelines for Conducting Preclinical Trials of Medicines. Part one / Ed. by A.N. Mironov. *Moscow: Grif and K, 2012. 944 p. (In Russ.)*]
9. Bilich T., Nelde A., Heitmann J.S., Maringer Y., Roerden M., Bauer J., Rieth J., Wacker M., Peter A., Hörber S., Rachfalski D., Märklin M., Stevanović S., Rammensee H.G., Salih H.R., Walz J.S. T cell and antibody kinetics delineate SARS-CoV-2 peptides mediating long-term immune responses in COVID-19 convalescent individuals. *Sci. Transl. Med., 2021, vol. 13, no. 590. doi: 10.1126/scitranslmed.abf7517*
10. Bonifacius A., Tischler-Zimmermann S., Dragon A.C., Gussarow D., Vogel A., Krettek U., Gödecke N., Yilmaz M., Kraft A.R.M., Hoepfer M.M., Pink I., Schmidt J.J., Li Y., Welte T., Maecker-Kolhoff B., Martens J., Berger M.M., Lobenwein C., Stankov M.V., Cornberg M., David S., Behrens G.M.N., Witzke O., Blaszczyk R., Eiz-Vesper B. COVID-19 immune signatures reveal stable antiviral T cell function despite declining humoral responses. *Immunity, 2021, vol. 54, no. 2, pp. 340–354.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2021.01.008*
11. Brouwer P.J.M., Caniels T.G., van der Straten K., Snitselaar J.L., Aldon Y., Bangaru S., Torres J.L., Okba N.M.A., Claireaux M., Kerster G., Bentlage A.E.H., van Haaren M.M., Guerra D., Burger J.A., Schermer E.E., Verheul K.D., van der Velde N., van der Kooij A., van Schooten J., van Breemen M.J., Bijl T.P.L., Slieden K., Aartse A., Derking R., Bontjer I., Kootstra N.A., Wiersinga W.J., Vidarsson G., Haagmans B.L., Ward A.B., de Bree G.J., Sanders R.W., van Gils M.J. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science, 2020, vol. 369, no. 6504, pp. 643–650. doi: 10.1126/science.abc5902*
12. Cassaniti I., Percivalle E., Bergami F., Piralla A., Comolli G., Bruno R., Vecchia M., Sambo M., Colaneri M., Zuccaro V., Benazzo M., Robotti C., Calastri A., Maiorano E., Ferrari A., Cambiè G., Baldanti F. SARS-CoV-2 specific T-cell immunity in COVID-19 convalescent patients and unexposed controls measured by ex vivo ELISpot assay. *Clin. Microbiol. Infect., 2021, vol. 27, no. 7, pp. 1029–1034. doi: 10.1016/j.cmi.2021.03.010*
13. Cunningham A.J., Szenberg A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology, 1968, vol. 14, no. 4, pp. 599–600. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1409394/*
14. Dan J.M., Mateus J., Kato Y., Hastie K.M., Yu E.D., Faliti C.E., Grifoni A., Ramirez S.I., Haupt S., Frazier A., Nakao C., Rayaprolu V., Rawlings S.A., Peters B., Krammer F., Simon V., Saphire E.O., Smith D.M., Weiskopf D., Sette A., Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science, 2021, vol. 371, no. 6529. doi: 10.1126/science.abf4063*
15. Jiang X.L., Wang G.L., Zhao X.N., Yan F.H., Yao L., Kou Z.Q., Ji S.X., Zhang X.L., Li C.B., Duan L.J., Li Y., Zhang Y.W., Duan Q., Wang T.C., Li E.T., Wei X., Wang Q.Y., Wang X.F., Sun W.Y., Gao Y.W., Kang D.M., Zhang J.Y., Ma M.J. Lasting antibody and T cell responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients three months after infection. *Nat. Commun., 2021, vol. 12, no. 1: 897. doi: 10.1038/s41467-021-21155-x*
16. Robbiani D.F., Gaebler C., Muecksch F., Lorenzi J.C.C., Wang Z., Cho A., Agudelo M., Barnes C.O., Gazumyan A., Finkin S., Hägglöf T., Oliveira T.Y., Viant C., Hurley A., Hoffmann H.H., Millard K.G., Kost R.G., Cipolla M., Gordon K., Bianchini F., Chen S.T., Ramos V., Patel R., Dizon J., Shimeliovich I., Mendoza P., Hartweg H., Nogueira L., Pack M., Horowitz J., Schmidt F., Weisblum Y., Michailidis E., Ashbrook A.W., Waltari E., Pak J.E., Huey-Tubman K.E., Koranda N., Hoffman P.R., West A.P.Jr., Rice C.M., Hatziioannou T., Bjorkman P.J., Bieniasz P.D., Caskey M., Nussenzweig M.C. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature, 2020, vol. 584, no. 7821, pp. 437–442. doi: 10.1038/s41586-020-2456-9*
17. Rook G.A., Steel J., Umar S., Dockrell H.M. A simple method for the solubilization of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon. *J. Immunol. Methods, 1985, vol. 82, no. 1, pp. 161–167. doi: 10.1016/0022-1759(85)90235-2*

18. Rydzynski Moderbacher C., Ramirez S.I., Dan J.M., Grifoni A., Hastie K.M., Weiskopf D., Belanger S., Abbott R.K., Kim C., Choi J., Kato Y., Crotty E.G., Kim C., Rawlings S.A., Mateus J., Tse L.P.V., Frazier A., Baric R., Peters B., Greenbaum J., Ollmann Saphire E., Smith D.M., Sette A., Crotty S. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*, 2020, vol. 183, no. 4, pp. 996–1012. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.038
19. Tan A.T., Linster M., Tan C.W., Le Bert N., Chia W.N., Kunasegaran K., Zhuang Y., Tham C.Y.L., Chia A., Smith G.J.D., Young B., Kalimuddin S., Low J.G.H., Lye D., Wang L.F., Bertoletti A. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell. Rep.*, 2021, vol. 34, no. 6. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108728
20. Wang Z., Yang X., Zhong J., Zhou Y., Tang Z., Zhou H., He J., Mei X., Tang Y., Lin B., Chen Z., McCluskey J., Yang J., Corbett A.J., Ran P. Exposure to SARS-CoV-2 generates T-cell memory in the absence of a detectable viral infection. *Nat. Commun.*, 2021, vol. 12, no. 1: 1724. doi: 10.1038/s41467-021-22036-z
21. Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J. Anaphylactogenic properties of soluble antigen antibody complexes in the guinea pig and rabbit. *J. Immunol.*, 1960, vol. 85, pp. 469–477. doi: 10.4049/jimmunol.85.5.469

Авторы:

Савин Т.В., врач аллерголог-иммунолог ДПО ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Копать В.В., директор по развитию ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

Рябенкова А.А., научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

Чирак Е.Л., научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

Чирак Е.Р., научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

Саенко А.И., главный технолог ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

Духовлинов И.В., к.б.н., директор по науке ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

Сысоева Г.М., ведущий научный сотрудник отдела биологических исследований Института медицинской биотехнологии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Гамалей С.Г., зав. отделом биологических исследований Института медицинской биотехнологии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Шимина Г.Г., научный сотрудник отдела биологических исследований Института медицинской биотехнологии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Таранов О.С., зав. отделом микроскопических исследований ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Даниленко Е.Д., к.б.н., директор Института медицинской биотехнологии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Симбирцев А.С., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией медицинской биотехнологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, 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 ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Savin T.V., Allergist-Immunologist, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Kopat V.V., Development Director, LLC “ATG Service Gene”, St. Petersburg, Russian Federation;

Riabchenkova A.A., Researcher, LLC “ATG Service Gene”, St. Petersburg, Russian Federation;

Chirak E.R., Researcher, LLC “ATG Service Gene”, St. Petersburg, Russian Federation;

Chirak E.L., Researcher, LLC “ATG Service Gene”, St. Petersburg, Russian Federation;

Saenko A.I., Chief Process Engineer, LLC “ATG Service Gene”, St. Petersburg, Russian Federation;

Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Director of Science, LLC “ATG Service Gene”, St. Petersburg, Russian Federation;

Sysoeva G.M., Leading Researcher, Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology of the State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of the Rospotrebnadzor, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Gamaley S.G., Head of the Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology of the State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of the Rospotrebnadzor, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Shimina G.G., Researcher, Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology of the State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of the Rospotrebnadzor, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Taranov O.S., Head of the Department of Microscopic Research, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of the Rospotrebnadzor, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Danilenko E.D., PhD (Biology), Director of the Institute of Medical Biotechnology of the State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of the Rospotrebnadzor, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Simbirtsev A.S., RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Medical Biotechnology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

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

AUTOIMMUNE DISORDERS IN PATIENTS WITH GRANULOMATOSIS DISEASES AFTER COVID-19: T- AND B-CELLS SUBSETS FUNCTION

A.A. Starshinova^{a,b}, I.V. Kudryavtsev^c, A.A. Rubinstein^c, A. Malkova^d, H. Ling^e, M. Zhuang^e, A.Yu. Starshinova^f, I.F. Dovgaluk^g, D.A. Kudlay^{h,i}

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

^b Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

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

^d Ariel University Faculty of Natural Sciences, Ariel, Israel

^e Harbin Medical University, Harbin, China

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

^g St. Petersburg Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

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

ⁱ Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

Abstract. Sarcoidosis and tuberculosis are both granulomatous diseases that have many similarities, making the differential diagnosis of sarcoidosis and tuberculosis difficult, as well as leading to inappropriate treatment selection of both diseases. Autoimmune inflammation (AI) is one of the processes identified tuberculosis and sarcoidosis. Current evidences about the risk and clinical outcomes of COVID-19 infection in patient with sarcoidosis and *M. tuberculosis* co-infection are still not well understood. SARS-CoV-2 has direct damage to the epithelial cells of the respiratory system, and in-directly due to circulatory disorders. **Materials and methods.** In the study we analyzed characteristics of autoimmune response in patients with granulomatosis diseases (tuberculosis and sarcoidosis) after COVID-19. We have analyzed articles for the period of December 2019 to March 2023, published in international database (“Medline”, “PubMed”, “Scopus”). The keywords we used “COVID-19”, “SARS-CoV-2”, “tuberculosis”, “sarcoidosis”, “granulomatosis diseases”, “T cells”, “B cells”, “Treg”, “follicular Treg” and “Treg subsets”. The narrative review was carried out in accordance with the PRISMA protocol (<http://www.prisma-statement.org>) used for this type of study (ID-423604). **Results.** The influence of COVID-19 infection can also make a significant contribution to the violation of the T- and B-cell immune response, the violation of the nature of cellular metabolism, which will affect the course of granulomatous inflammation in various ways. According to the different researches, autoimmune inflammation can be an important protective mechanism in sarcoidosis and, at the same time, exacerbates the course of tuberculosis infection with the disease progression and pathogen drug resistance formation subsequently. The study of immune response features in patients with COVID-19 showed the presence of several similar characteristics in cellular components of the immune response. **Conclusion.** Evidence of the presence of autoimmune inflammation in patients with these granulomatous lung diseases, the development of patient immunotypes, including the transferred COVID-19, will be a significant contribution to the development of personalized patient management tactics, taking into account the identified violations of the immune response mechanisms.

Key words: autoimmunity, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis diseases, T cell, B cell, Treg, follicular Treg, Treg subsets, prognosis.

Адрес для переписки:

Рубинштейн Артем Аркадьевич
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (921) 849-27-04. E-mail: arrubin6@mail.ru

Contacts:

Artem A. Rubinstein
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Academician Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (921) 849-27-04. E-mail: arrubin6@mail.ru

Для цитирования:

Старшинова А.А., Кудрявцев И.В., Рубинштейн А.А., Малкова А., Лин Х., Чжуан М., Старшинова А.Ю., Довгалюк И.Ф., Кудлай Д.А. Аутоиммунные нарушения у больных гранулематозными заболеваниями после COVID-19: функционирование субпопуляций Т- и В-клеток // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 251–266. doi: 10.15789/2220-7619-EOU-16874

Citation:

Starshinova A.A., Kudryavtsev I.V., Rubinstein A.A., Malkova A., Ling H., Zhuang M., Starshinova A.Yu., Dovgaluk I.F., Kudlay D.A. Autoimmune disorders in patients with granulomatosis diseases after COVID-19: T- and B-cells subsets function // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 251–266. doi: 10.15789/2220-7619-EOU-16874

The work was carried out in the frames of the State Assignment of Institute of Experimental Medicine (FGWG-2022-0005, No. 122020300186-5) and of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in the framework of a scientific project under agreement No. 075-15-2024-631.

© Starshinova A.A. et al., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-EOU-16874>

АУТОИММУННЫЕ НАРУШЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ГРАНУЛЕМАТОЗНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОСЛЕ COVID-19: ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т- И В-КЛЕТОК

Старшинова А.А.^{1,2}, Кудрявцев И.В.³, Рубинштейн А.А.³, Малкова А.⁴, Лин Х.⁵, Чжуан М.⁵, Старшинова А.Ю.⁶, Довгалюк И.Ф.⁷, Кудлай Д.А.^{8,9}

¹ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Университет Ариэль, Ариэль, Израиль

⁵ Харбинский медицинский университет, г. Харбин, Китай

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

⁷ ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

⁸ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, Россия

⁹ ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Резюме. Саркоидоз и туберкулез являются гранулематозными патологиями, имеющими большое количество схожих черт, из-за которых возникают трудности в дифференциальной диагностике этих заболеваний, что в дальнейшем приводит к неправильному выбору тактики лечения пациентов. Аутоиммунное воспаление (АВ) является одним из процессов, выявленных как при туберкулезе, так и при саркоидозе. Текущие данные о риске и клинических исходах инфекции COVID-19 у пациентов с саркоидозом либо с сочетанной инфекцией *M. tuberculosis* все еще недостаточно изучены. SARS-CoV-2 оказывает как прямое патологическое действие на эпителиальные клетки дыхательной системы, так и опосредованное за счет нарушений кровообращения. *Материалы и методы.* В этом исследовании мы изучили особенности аутоиммунного ответа у пациентов с гранулематозными заболеваниями (туберкулезом и саркоидозом) после COVID-19. Мы проанализировали статьи с декабря 2019 по март 2023 г., опубликованные в международных базах данных («Medline», «PubMed», «Scopus»). Ключевые слова, которые мы использовали: «COVID-19», «SARS-CoV-2», «туберкулез», «саркоидоз», «гранулематозные заболевания», «Т-клетки», «В-клетки», «Treg», «фолликулярный Treg» и «Подмножества Treg». Описательный обзор проводился в соответствии с протоколом PRISMA (<http://www.prisma-statement.org>), используемым для этого типа исследования (ID-423604). *Результаты.* COVID-19 вносит существенный вклад в нарушение Т- и В-клеточного иммунного ответа. Коронавирусная инфекция может изменить и характер клеточного метаболизма, что отразится на течении гранулематозного воспаления. По данным различных исследований, аутоиммунный компонент может быть важным защитным механизмом при саркоидозе и, в то же время, он способен усугублять течение туберкулезной инфекции, приводить к прогрессированию заболевания с формированием в дальнейшем лекарственной устойчивости возбудителя. Изучение особенностей иммунного ответа у пациентов с COVID-19 и пациентов с интерстициальными заболеваниями легких показало наличие ряда схожих характеристик у клеточных компонентов иммунного ответа. *Заключение.* Доказательства наличия аутоиммунного воспаления у пациентов с данными гранулематозными заболеваниями легких, определение иммунотипов пациентов, в том числе перенесших COVID-19, будут вносить существенный вклад в разработку персонализированной тактики ведения пациентов с учетом выявленных нарушений механизмов иммунного ответа.

Ключевые слова: аутоиммунитет, туберкулез, саркоидоз, гранулематозные заболевания, Т-клетки, В-клетки, Treg, фолликулярные Treg, субпопуляции Treg, прогноз.

Introduction

It is now known that the development of autoimmune diseases is multifactorial, and they follow regularities of additive polygenic inheritance with a threshold effect of a number of natural factors and sociocultural-anthropogenic epigenetic factors [34]. Currently, numerous studies demonstrated that a combination of many factors, including non-infection and infection triggers in individually special immunogenic predictors with special reactivity, activated autoimmune inflammation (AI) with development and progression of the disease [105, 118, 125, 127]. As we know, tuberculosis (Tbc) and sarcoido-

sis are similar to granulomatous disease. However, the AI has been diagnosed in both diseases with different etiologies [11, 27, 136].

Various T-cell subsets play an important part in the pathogenesis of autoimmune diseases, represented by Th1, Th17, regulatory T cells (Treg) and CD8⁺ T-cells [9, 99]. It is believed that the ratio of Th17 cells, stimulating the immune response, and Treg cells, that are suppressors of immune responses, can lead to the formation of autoimmune inflammation which is characterized by the presence of self-specific CD3⁺ T-cells and CD19⁺ B-cells [65, 61]. It is also known that uncontrolled chronic infections, including *M. tuberculosis* infection, are commonly

accompanied by AI with violation of T- and B-cell link of the immune response, however, little attention is paid to this issue [4, 21].

The phenotypic assessment of B-cells is able to indirectly reflect the functions of certain subsets of B-cells [135]. Recent studies have shown that in the peripheral blood of patients with sarcoidosis, the subpopulation of 'naïve' B cells with the CD19⁺IgD⁺CD38⁻ phenotype reduce and activate resting memory of B cells with CD19⁺IgD⁻CD38⁺ and CD19⁺IgD⁻CD38⁻ phenotypes, respectively. There are few studies in tuberculosis [104, 149]. Furthermore, the theory of the development of vimentin autoantibodies has become widespread [126]. The role of vimentin, which is present in cells and extra cellular matrix of connective tissues, and is involved in different types of cell-to-cell interactions, as well as in immune response regulation, has been known for a long time [90]. Bagavant et al. found an increased titer of IgG to vimentin in patients with sarcoidosis compared with healthy controls [10]. However, other researchers, despite the discovery of autoantibodies to vimentin, denied their significant impact on the pathogenesis of sarcoidosis in general [90]. Therefore, the part of autoantibodies in the pathogenesis of sarcoidosis is still open.

According to the results of our recent studies, it was noted that patients with tuberculosis had a significantly high level of autoantibodies in citrullinated vimentin [20, 90]. A number of clinical manifestations in tuberculosis indicated that the interaction of the host with mycobacterial antigens causes the subsequent development of an additional autoimmune inflammatory process, aggravating the pathology of tuberculosis. *M. tuberculosis* affects extensive destruction of the extracellular matrix and the breakdown of collagen and elastin which promote the release of new potentially autoreactive epitopes [122, 124]. At the same time, one of the most important ways to avoid the immune response of *M. tuberculosis* is the ability to destroy normal functioning of the cells of the immune system and their metabolism. For example, after PRR recognition that is responsible for endocytosis, *M. tuberculosis* is taken up by phagocytic host cells (macrophages, neutrophils and dendritic cells, DCs) and internalized into the phagosome [140]. Studies have shown that *M. tuberculosis* actually uses disruption of phagosome-lysosome fusion and blockade of acidification of the environment in the phagosome in order to avoid cell destruction and antigen presentation to acquired immune cells to trigger a specific immune response. The effectiveness of the approaches that is described above, it is an evidence that up to 70% of phagosomes, containing *M. tuberculosis*, do not fuse with lysosomes [48, 140].

The emergence of COVID-19 and the rapid spread of the SARS-CoV-2 virus in worldwide has revealed the dramatic changes in the immune response of infected patients, affected COVID-19 with varying de-

grees of severity [139]. The SARS-CoV-2 has now been shown to be able to suppress the innate mechanisms of the antiviral response [116]. The lymphopenia was described in many patients is mainly characterized by a decrease in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, which is a characteristic feature of coronavirus infections. This apparent change in T-cell populations demonstrates the significance of their role in the infection. SARS-CoV-2-specific CD4⁺ T-cells express IFN γ , TNF and IL-2, indicating that patients with SARS-CoV-2 infection exhibit Th1 cellular responses. The importance of CD4⁺ T-cells has been shown in murine models of infection, where T-cell depletion was accompanied with the development of more severe inflammation in the lungs [57, 151]. At the same time, immunization of mice with SARS-CoV-2 peptide-derived dendritic cells induced the formation of virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells massively infiltrating the lungs, leading to increased survival [151]. Moreover, translocation of SARS-CoV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells into immunodeficient mice contributed to better protection against the mouse-adapted strain SARS-CoV-2 [38]. In addition to lymphopenia, patients with COVID-19 also showed increased T-cell depletion, decreased functional diversity, and correlation with disease progression. We hypothesise that COVID-19 would alter the immune status of tuberculosis [88] and sarcoidosis patients [129], but with different manifestations and consequences.

Thus, the review helps to understand key immunological points in pathogenesis of autoimmune inflammation in patients with the most frequent granulomatous lung diseases (sarcoidosis and tuberculosis), similar in clinical and radiological symptomatology and different in etiology, based on changes in T- and B-cell subsets after COVID-19.

The aim of our study was to determine characteristic of autoimmune inflammation in development and progression of the disease, and to analyze T- and B-cell subsets roles in patients with granulomatosis diseases (sarcoidosis and tuberculosis) after COVID-19.

Materials and methods

We have analyzed articles for the period of December 2019 to March 2023, published in international database ("Medline", "PubMed", "Scopus"). The keywords we used "COVID-19", "SARS-CoV-2", "tuberculosis", "sarcoidosis", "granulomatosis diseases", "T cells", "B cells", "Treg", "follicular Treg" and "Treg subsets". Inclusion criteria were original research with observation of patients with sarcoidosis, Tbc and COVID-19, meta-analysis, review articles and research articles. Exclusion criteria: books, result of clinical trials, clinical cases. Totally, 37 publications were processed. The narrative review was carried out in accordance with the PRISMA protocol (<http://www.prisma-statement.org>) used for this type of study (ID-423604).

Results

Autoimmune response in patients with granulomatosis diseases (sarcoidosis and tuberculosis) and COVID-19

The clinical symptoms in patient with sarcoidosis and tuberculosis prone to chronic and generalized cause, based on tissue sites of chronic inflammation that are driven by delayed-type hypersensitivity (DSH) mechanisms are very similar [40]. Their course, degree of epidemiology danger, treatment management and prognosis are significantly different [34, 136]. The identification of the etiological factors and pathogenesis of the disease in such cases can be a key factor in the choice of management, determining its effectiveness [95]. The main proof of the tuberculosis etiology of the process is the isolation of *M. tuberculosis* using bacteriological diagnostic methods, which determines the basic principle of anti-tuberculosis therapy — exposure to the pathogen [34].

The interaction of the *M. tuberculosis* with the host organism is poorly understood and may result in the activation or the localization of the infection [118]. Despite two decades of an intensified research to understand and cure tuberculosis disease, biological uncertainties remain and hamper the progress. The problem of the spread and treatment of drug-resistant tuberculosis became even more urgent. With the rise of drug resistance, treatment failure rates have increased along with the use of more toxic therapies that are far more costly [138].

Recently, the interest and the research on the autoimmune aspects in tuberculosis have been increasing. It is widely accepted, that many autoimmune diseases could be promoted by inefficiently controlled and/or wrong targeted immune responses to different types of pathogens, including *M. tuberculosis* [118, 82]. *M. tuberculosis* infection is a multifaceted process and has many different outcomes and complications. Moreover, autoimmunity is one of the processes characteristics of *M. tuberculosis* infection [122]. The role of autoantibodies, produced by self-reactive plasma cells, in the pathogenesis of Tbc is not quite clear and widely disputed [95]. However, autoantibodies production could be considered as the result of poorly controlled and imbalanced immune response, as well as a critical part of pathogenesis of tuberculosis. Autoantibodies during *M. tuberculosis* infection might be the markers of comorbid, or even might provoke and upregulate autoimmune inflammation in chronically inflamed tissues. However, there is an alternative point of view regarding increased titers of self-reactive antibodies as a part of protective mechanisms, helping in the clearance of damaged tissue debris [124].

Unlike tuberculosis, sarcoidosis is one of the few diseases similar in its characteristics but with an unspecified etiology, leading to a large number of di-

agnostic errors and a lack of personalized management [117, 119]. Many researchers have been looking for pathophysiological similarities between *M. tuberculosis* infection and sarcoidosis, based on mycobacterial components and/or specific to *M. tuberculosis* antibodies detection in patients with sarcoidosis [111, 115, 117]. Currently, the role of *M. tuberculosis* as one of the main etiological factors in sarcoidosis is still unconfirmed. But the concept of tuberculosis and sarcoidosis as two responses, whose differences are determined by various organism relativities and conditions, to closely related etiological factors — is still being developed [82]. The study of the Mbc role as a classic adjuvant factor of autoimmune inflammation, is also continuing in this context [84, 122].

It is well-known that the one of the key feature of sarcoidosis pathogenesis is granulomas formation in lungs, lymph nodes of different localization, spleen, skin, and other organs. In patients who are genetically predisposed to sarcoidosis, a contact of antigen-presenting cells (monocytes, macrophages, dendritic cells) with an unknown non-self antigen may result in imbalanced immune inflammation that may manifest in granulomas formation [113]. Unlike *M. tuberculosis*-mediated granulomas in sarcoidosis necrotic masses are not formed in granulomas and serum angiotenzin-converting enzyme hyperproduction occurs [123]. The central part of the epithelioid cell granuloma is composed of activated macrophages, epithelioid cells and giant cells, as well as with CD4⁺ T-cells between them [6]. Furthermore, the peripheral area of a granuloma contains CD8⁺ T-cells, fibroblasts, macrophages, and fibrocytes, while CD19⁺ B-cells are not typical for granulomas in sarcoidosis [6]. Innate immunity macrophages and dendritic cells are the first immune cells to meet the non-self molecules due to the presence of pattern-recognition receptors (PRRs) [147]. Long-term exposure of PRRs to foreign molecules results in high rates of cells activation, proinflammatory cytokine production and epithelioid differentiation of tissue-resident macrophages and peripheral blood monocytes. Moreover, having recognized and internalized antigens, activated dendritic cells migrate to the nearest lymph node, where they present the antigens CD4⁺ and CD8⁺ T-cells [58, 150].

Currently, special attention is paid to the part of Th17 cells in the pathogenesis of sarcoidosis [81]. These CD4⁺ T-cells expressed IL 17A and IL-22, as well as showed many pro-inflammatory properties. Furthermore, it was showed that macrophages from granuloma in patients with sarcoidosis express CCL20, that unregulated Th17 cells migration to inflamed tissue, while IL-23 expression causes a significant increase in IL-17A production in the sites of granuloma formation during sarcoidosis [17]. Furthermore, it was shown that anti-inflammatory M2 phenotype was predominant for tissue macrophages in sarcoidosis granulomas, and their fre-

quencies and activation status were linked with disease progression [17]. Moreover, *in vitro* and *in vivo* models also revealed that these cells play an important part in granuloma formation at the initial stages sarcoidosis. Recently, mTOR signaling pathway also takes part in sarcoidosis and important for macrophages during granuloma formation [78]. For instance, mTORC1 activation in murine macrophages resulted in disease progression and formation of granulomas [78]. Thus, metabolic adaptation of different tissue resident and peripheral blood cells to the inflammatory conditions in granuloma affected autophagy regulation, as well as influenced the effectiveness of antigen clearance and promoted the persistence/progression of granuloma in general [27]. To date, the diagnosis and treatment of *M. tuberculosis* infection remain a problem for the world community. Vaccination with the use of BCG, the use of new drugs did not allow coping with the annual spread of infection and the formation of drug-resistant forms of tuberculosis [118].

Studies of the autoimmune response in Tbc have been conducted since the middle of the XIX century. Many scientists note the presence of clinical symptoms of autoimmune diseases in tuberculosis patients, the appearance of autoantibodies, the presence of a genetic predisposition [1, 34]. The existing assumptions have not yet found unambiguous evidence of the autoimmune inflammation in tuberculosis and its effect on the course of the disease, but research in this direction continues. Previously, the relationship between the development of autoimmune pathology after the introduction of an attenuated strain of *M. bovis* was shown. *M. bovis* is the main causative agent of tuberculosis in cattle and it is used for immunization in humans to date, both for the prevention of Tbc and for the treatment of oncological pathology and even severe COVID-19 [16]. In the experiment, *Mtb* is quite often used as an adjuvant, for example, in a complete Freund adjuvant in animal models of autoimmune diseases [11], which is presumably related to the fact that these antigens overcome tolerance to host antigens when co-administered. In experimental models, *Mtb* immunization can cause autoimmune joint lesions by the cross-reactivity with proteoglycan in cartilage [12].

Currently, there are evidences of the trigger role of *M. tuberculosis* in the development of different autoimmunity diseases, including systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, sarcoidosis, primary biliary cirrhosis and many others [35, 102]. No reliably known mechanisms for antibodies formation in tuberculosis which have been identified to date. There are assumptions about possible mimicry between the antigenic structure of mycobacteria and the host tissue's own antigens [14].

At the same time, a number of studies had shown that during *M. tuberculosis* infection approximately

40% of patients had increased titers of self-reactive antibodies, that were typically detected in patients with polyangiitis, systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases [34]. Statistically significant increase in plasma concentrations of antibodies in tuberculosis patients was diagnosed to ribonucleoproteins (15%), anti-SSA (64%) and anti-ACA-IgM antibodies (59%) [53]. In some cases, high levels of autoantibodies to neutrophil cytoplasm, beta-2-glycoprotein (anti-b2GPI), cyclic citrullinated peptide, as well as anticardiolipin antibodies were found. Moreover, the serum levels of detection autoantibodies in some cases were very similar to patients with autoimmune diseases, while the effective anti-tuberculosis treatment led to down-regulation of some self-reactive antibodies levels [25].

Previously, Elkholy et al. reported that the frequency of CD19⁺ B-cell in peripheral blood samples from patients with active pulmonary tuberculosis was significantly lower than in control group [34]. In contrast, Wu et al. found that CD19⁺ B-cells were higher in patients with Tbc vs control group [143]. We noticed no differences in relative and absolute numbers on total CD19⁺ B-cell subset between *M. tuberculosis* infected patients and healthy controls, but we found dramatic alterations in B cell subsets composition. The presence of an autoimmune component is associated with an increase in the level of autoantibodies may be significant for the correction of therapy and serve as a criterion for considering the appointment of immunosuppressive therapy in the future. Probably, autoantibodies elevation could be linked with molecular mimicry, that could be on of the pathogens strategies of immune evasion during chronic infections and hyperactive immune response. For instance, some *M. tuberculosis* heat shock proteins, including *Mtb*-HsP60, *Mtb*-HsP65, and mKatG, could be considered as the mycobacterial candidate antigens with predicted involvement in cross-reactions [33]. The presence of antibodies in patients with tuberculosis may reflect the relationship between the pathogenesis of those diseases with the possibility of cross-reactivity between vimentin and *M. tuberculosis* peptides [130].

SARS-CoV-2 virus may exacerbate the course of the disease, which could be associated with increased autoimmune inflammation and altered immune response [15, 64]. SARS-CoV-2 is also able to suppress antiviral responses as the part of its immune evasion strategy. As it was shown previously, lymphopenia was described in many patients, mainly characterized by a decrease in the number of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, which is a characteristic feature in a number of coronavirus infections as well [36, 45, 83].

Special form of hyper-inflammatory reactions in response to SARS-CoV-2 may develop in some patients, leading to autoimmune reactions [28, 100]. Apparently, the main role in this case is played by a genetic predisposition to this. In such cases, hy-

perinflammatory reactions in response to SARS-CoV-2 lead to the rapid formation of autoimmune and/or autoinflammatory dysregulation and, as a consequence, to the development of severe interstitial pneumonia [100]. One of the explanations for the development of autoimmune complications may also be the molecular similarity of SARS-CoV-2 Sproteins with surfactant proteins that Kanduc study showed [28]. The course of COVID-19 infection can be significantly influenced not only by factors of the genetic predisposition of the host organism, but also by existing diseases that affect the lung tissue. In this regard, the study of various forms of the course of COVID-19 in patients with tuberculosis is the particular interest. Immune response in patients with *M. tuberculosis* infection, sarcoidosis and SARS-CoV-2 infection are presented in Table.

Recent studies have shown that the incidence of CD4⁺CD25⁺ T cells was higher in patients with active Tbc in contrary with latent Tbc. However, there were no differences in relative number of Treg cells, identified by flow cytometry as CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, or CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{lo} [146]. A correlation analysis revealed the close link between the stages of treatment in patients with tuberculosis and Treg cells. Prior to treatment, patients had higher frequencies of CD4⁺CD25^{high} Treg and more pronounced expression of FoxP3 in peripheral blood compared to healthy controls [44]. Overall, on and tuberculosis show that this is not an unambiguous problem. In conditions of excessive inflammation regulatory T cells in Tbc may be useful [21].

In sarcoidosis, there was a decrease in the number of Tregs cells in bronchoalveolar lavage (BAL), while, oppositely, in the peripheral blood samples these cells increased. However, in the same group of patients, peripheral blood Treg cells were three times lower if compared to healthy donors [50]. In addition, many studies have noted a decrease in the level of the Treg transcription factor FOXP3 in BALF, which indicates a decrease in the functionality of these cells [30, 50, 88]. Recently, we noted that the relative numbers of central memory CD45RA-CCR7⁺ Tregs was decreased in patients with sarcoidosis, while the frequency of circulating effector memory and effector Tregs was increased if compared to healthy controls [66]. In our previous studies, we also noticed an evaluated CD39 expression on the surface of Treg cells in both acute and chronic sarcoidosis [51]. We have found that the content of CD39-positive cells increases in both chronic and acute sarcoidosis. In addition, the level of CD39⁺ cells among CD45R0⁺CD62L⁺ T-regulatory central memory cells in patients with both acute and chronic sarcoidosis significantly exceeded the values in the control group. CD45R0⁺CD62L⁻ T-regulatory effector memory cells increased in peripheral blood only in the chronic sarcoidosis group. We have also shown that in chronic sarcoidosis the content of the total phenotype of T-regulatory cells in the peripheral blood is significantly lower than that in the control group [51]. Thus, alterations in Treg cell numbers in circulation, their phenotypes and/or functional activity could be associated with high risk of autoimmune diseases in numerous models and human autoimmune diseases [71].

Table. Features of the immune response in patients with Tbc, sarcoidosis and COVID-19

Cells	COVID-19	Sarcoidosis	Tuberculosis
Th1	↑[54, 112]; ↓[43, 107, 109]	↑[91]; ↓[67]	↑[79, 132]
Th2	↑[31, 41, 43]	↑[67, 74, 91]	↑[62, 68]; not significant [79]
Th17	↑[96, 137, 142]; ↓[31, 37, 43, 54]	↑[101, 103]; ↓[131]	↓[62, 68]
Tfh	↑[41, 112]; ↓[43, 54, 56]	↑[29]; not significant [67, 65]; ↓[80]	↑[68]; ↓[68] not significant [62]
Treg	↑[22, 128]; ↓[63, 89]	↑[18, 88]; ↓[47, 50, 51]	↑[23, 26, 44, 114, 146]
Th maturation			
“naive” Th	↓[7, 86]	↓[32, 68]	not significant [68]
CM Th	↑[108, 121]	↓[68]	↓[68]
EM Th	↑[86]	↓[68]	↑[134]; not significant [68]
TEMRA Th	↑[31, 86]	↑[68]	↑[68]; ↓[134]
Tcvt maturation			
“naive” Tcvt	↑[92]; ↓[31, 70, 141]	↓[75]	↓[134]
CM Tcvt	↑[46, 70, 141]; ↓[31, 92]	↓[75]	↓[134]
EM Tcvt	↑[3, 86]; ↓[46, 70, 86]	↓[75]	↓[134]
TEMRA Tcvt	↑[60, 86]; ↓[70]	↑[75]	↑[134]
B-lymphocytes			
“naive” B-cells	↓[31, 69]	↑[65, 80, 110]	↓[52]
Memory B-cells	↓[31, 69]	↓[65, 80, 110]	↓[2]
Plasmablasts	↑[31, 56, 69, 120]	↑[65, 110]; not significant [80]	↓[2]

Similarity of immune response in COVID-19, sarcoidosis and tuberculosis

It is considered that both for sarcoidosis and tuberculosis, an autoimmune damaging component of healthy lung tissue is involved (Fig., cover II).

For example, for acute respiratory distress syndrome while COVID-19 infection a neutralising auto-antibodies to type I IFNs were determined [133]. It is known that these types of interferons are responsible for MHC molecules' expression increment in infected cells and virus elimination from the organism [106]. Natural and adaptive immunity is also relevant in fibrogenesis for these pathologies [148]. This is why the research of immunocompetent cells separately and in combination is substantial. This could be the key for determination of prognosis for patients with comorbidity, as well as an assistance for further therapy correction. Nowadays it is possible to parallel Th1 in these pathologies. When recognizing a specific antigen in peripheral tissues effector Th1 cells produced IFN γ , that activates various innate and adaptive immunity cells, including CD8⁺ T-cells, ILC1 and macrophages, that take part in pathogen elimination [9]. Hyperproduction of IFN γ and TNF α by Th1 cells as the response for SARS-CoV-2, as well as mass virus infected cell death can lead to lung tissue damage and trigger acute respiratory distress syndrome. Thus, Th1 cells migration to inflamed tissues marginally specifies certain fraction decrease of these cells in patients' peripheral blood when in the acute phase of infection. This Th1 cells migration was noted in several independent researches [72, 112]. Thereby an opportunity of revealing new data of immune variation for patients with tuberculosis and lung sarcoidosis and their impact on disease progress after COVID-19 is crucial and prompt. A practical application of received data can raise the effectiveness of curation and observation of patients with tuberculosis and sarcoidosis in future.

Discussion

SARS-CoV-2 has many harmful direct effects on various cell of different location, these effects could directly damage to the cells of the respiratory system, as well as could effect in-directly causing circulatory disorders. The direct cytotoxic effect of SARS-CoV-2 virus is due to the virus penetration to ACE2-expressing cells — alveolocytes, which leads to pneumonia development [77]. There is an unrestricted inflammatory infiltration of immune cells in the lungs which, in addition to direct viral damage, take part in self tissue damage due to excessive secretion of proinflammatory cytokines and chemokines, proteolytic enzymes and reactive oxygen species. Diffuse alveolar damage, characterized by desquamation of alveolar cells, the formation of hyaline membranes, and the development of pulmonary edema. Finally, microcirculation distur-

bance due to endothelial cell and vascular, as well as increased thrombus formation increase lung tissue damage and reduce the effectiveness of reparative processes in general [144].

In severe COVID-19, a cytokine storm develops, characterized by the production of vascular growth factor (VEGF), monocyte chemoattraction protein-1 (MCP-1), IL-8, and additionally IL-6 [49, 55, 59]. There is an activation of alveolar macrophages, the complement cascade along the lectin pathway, locally formed immune complexes that enhance pro-inflammatory processes. Activation of the complement system leads to damage to the endothelium, and also induces leukocytes through components C3a and C5a to produce pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6, IL-8, and IFN γ [8].

It should be noted that in patients with severe COVID-19 showed increase in serum CXCR9 and CXCR10. They together with increased levels of both cellular ("non-classical" monocytes, CD38⁺HLA-DR⁺ T cells and granzyme-B⁺/perforin⁺ T-cells) and serum (CXCL8, IL-6 and IL-10 levels) factors made it possible to differentiate mild and severe course of the disease [97]. The data obtained, according to the authors of the study, indicate the fact that polarization towards Th1 is associated with a high cytolytic profile of T cells in patients with severe COVID-19. Moreover, when analyzing BAL cells from patients with COVID-19, an increase in the proportion of IFN γ and/or TNF α producing Th1 was noted, whereat the mRNA level an increase in the expression of chemokines CCL4 and CCL5 or CCL2, CCL18, CXCL9, CXCL10 and CXCL11 was noted, respectively, which contributed to the attraction of leukocytes to the focus and inflammation in the lung tissue [145].

The interaction of CXCR3 with ligands plays an important role in infectious, autoimmune, and oncological diseases, as well as in a number of pathological conditions associated with dysregulation of angiogenesis [13]. The chemokine receptor CXCR3 interacts with several ligands (chemokines), including CXCL9 or MIG (monokine induced by gamma-interferon), CXCL10 or IP-10 (interferon-induced protein of 10 kDa), as well as CXCL11 or I-TAC [42]. All of the listed CXCR3-binding chemokines have a number of functional features [42]. Migration of CD4⁺ T-cells from peripheral blood to damaged tissues in sarcoidosis is possible due to the presence of the chemokine receptor CXCR3 on the cell surface. A number of papers were devoted to the study of ligands for CXCR3 in sarcoidosis [73]. This was determined that CXCR3-expressing cells were involved in the formation of granulomas in sarcoidosis, and, on the other hand, the main inducer of the synthesis of all the studied CXCR3 ligands was IFN γ , which played an important pathogenetic role in the development of immune responses during sarcoidosis [19]. It was also noticed that in sarcoidosis CXCR3

ligands — CXCL9, CXCL10, CXCL11 — provide CD4⁺ T-cell and monocytes homing to the lesions for further formation of granulomas [73]. These chemokines are also involved in angiogenesis and cell proliferation in sarcoidosis. The typical adaptive immune response in sarcoidosis is characterized by the presence of IFN γ producing CD4⁺ cells in inflamed tissues, which supports the idea that sarcoidosis is a T-helper cell type 1 (Th1) disease.

The literature data on the possible use of the levels of CXCL9, CXCL10, CXCL11 — chemokines in the peripheral blood of patients with sarcoidosis for clinical and laboratory generalizations. Some authors point the role of CXCL10 in the mechanisms of granuloma formation in both acute and chronic sarcoidosis [73]. Similarly, Arger et al. indicated that increased the level of peripheral blood and BAL CXCL11 in patients with sarcoidosis correlated with a decrease in respiratory function, lung volumes, and, accordingly, with a worsening of the course of the disease.

In sarcoidosis, there is also local overproduction of Th1 profile cytokines such as IL-2 and (IFN γ) associated with high expression of macrophage-derived molecules such as IL-15, CXCL10, CXCL16, CCL5 and CCL20 [19]. The activity of Th1 is associated with the intensity of the process of granuloma formation, the nature of the clinical course of sarcoidosis and its outcome. It is worth remembering that Th17 lymphocytes are actively involved in the pathogenesis of most inflammatory processes in autoimmune and infectious diseases. The pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and IL-23 play the most important role in the “polarization” of Th0 towards Th17 [146] and their attraction to the focus of inflammation, and IL-22, the main function of which is the activation of the protective functions of the cells of the epithelial layers [5]. With COVID-19, a decreased levels of Th cells carrying on their cell-surface key Th17 antigens — CD161 and CCR6 — were noted, compared with the control group [85]. It is worth remembering that Th17 lymphocytes are actively involved in the pathogenesis of most inflammatory processes in autoimmune and infectious diseases. The pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and IL-23 play the most important role in the “polarization” of Th0 towards Th17 [85]. Next, Th17 migrated to the sites of inflammation, and produced IL-22, that played the initial role in activation of epithelial layers cells activation and increase of their protective functions [5, 85].

Similar results were obtained using methods of molecular biology, when it was shown that expression of Th17-associated genes were reduced in peripheral blood CD4⁺ T-cells of patients with severe COVID-19, for example, RORC, IL17A, IL17F, and CCR6 [85]. These cells migrated to the sites of infection, which was confirmed by studies of BAL. In bronchoalveolar lavage fluid during COVID-19 infection, Th17 had the phenotype of tissue resi-

dent memory T cells, and also expressed genes associated with cytolytic properties (SRGN, GZMB and GNLY) and cytokine genes — IL-21, IL-17F, IL-17A, IFN γ and GM-CSF. Next, the lung tissues of COVID-19 patients were enriched in cells co-expressing CCR6 and IL-17A, and high levels of IL-6, IL-17A, GM-CSF and IFN γ were found in BALF, which may explain the volumetric inflammatory changes in severe patients. with pneumonia [54]. This subpopulation of CD3⁺CD4⁺ cells has also been considered in sarcoidosis. The frequency of T-cells producing IL-17 increased in the peripheral blood and lungs of patients with sarcoidosis compared with the control group [131]. Moreover, IL-17A was showed in mature granuloma formation in response to mycobacterial infections [94]. A recent large case-control study confirmed an association between genetic variants of the IL-23 receptor (which promotes the Th17 response) in different cohorts of patients with sarcoidosis [39].

Previously, we have already determined that in the chronic course of sarcoidosis, the number of Th17 lymphocytes in the peripheral blood is increased relative to the group of patients with an acute course of the same disease [39, 131]. This confirms the assumption that Th17 is mainly involved in the acute phase of inflammation, synthesizing a large number of pro-inflammatory cytokines.

In tuberculosis, the main role in the immune response is played by adaptive immunity, which is carried out mainly by T lymphocytes. Th1 cells contribute to protection against tuberculosis by secreting IFN γ and activating antimycobacterial activity in macrophages [81]. There is a hypothesis that the balance between Th1 and Th17.1 lymphocytes with a higher content of Th1 cells compared to Th17.1 may contribute to the development of an effective immune response to the penetration of *M. tuberculosis* into the cell [81]. In some studies, the production of antigen-specific IFN γ by Th1 cells correlated with a decrease in mycobacterial load [81]. Similarly, in bronchoalveolar lavage fluid there was an increased number of Th1 lymphocytes, as well as cytokines of the profile of the same cells — IFN γ and TNF α compared with healthy controls. However, the number of Th1 cells, IFN γ and TNF α did not differ from those in patients with sarcoidosis [23, 98].

In our previous studies, it was demonstrated that the level of Th17 cells in peripheral blood significantly decreased in patients with tuberculosis [68]. Similar results were obtained when subset composition of peripheral blood Th in Tbc was analyzed using *in vitro* nonspecific stimulation methods, when it was shown that the level of CD4⁺IL-17A⁺ cells decreased during infection [93]. Similarly, elevated levels of CD4⁺IL-17⁺ T-cells were found in the lungs, that process confirmed the migration of this subpopulation to the site of inflammation during acute infection [76]. Effector antigen-specific Th17 in pe-

ripheral tissues produce effector cytokines (IL-17A, IL-17F and IL-22), which activate various immune and non-immune cells of connective tissues, increasing the efficiency of their defense reactions aimed at eliminating extracellular pathogens [76]. Moreover, a decrease in the level of IL-17 in the peripheral blood of patients with tuberculosis was closely associated with the low effectiveness of the therapy used and the poor outcome of this disease [24].

Conclusion

Current evidences about the risk and clinical outcomes of COVID-19 infection in patient with sarcoidosis and tuberculosis are still not well understood. COVID-19, sarcoidosis and tuberculosis share similar common pathogenetic pathways, and all three diseases affect primarily the lung tissue. Multiple sets of conflicting clinical data showed that patients with sarcoidosis and tuberculosis immune response correlated with decreasing pulmonary function and higher risk of adverse outcomes from COVID-19. In some

respects, the immune responses during COVID-19 and two pulmonary conditions had some similarities, ranging from the Th-cell subsets imbalance, inflammatory cytokines production to altered B cell activation and excessive infiltration of inflammatory sites by highly activated peripheral blood cells, which could lead to excessive tissue damage. Therefore, the identification of new immunological features of sarcoidosis and tuberculosis during or following SARS-CoV-2 infection will provide us with a deeper understanding of the diagnosis and treatment of these pathological conditions.

Additional information

Contributors. A.S., I.K., and A.R. analysis of the materials, wrote the manuscript; A.G. analysis of the materials, wrote the manuscript, coordinator of the project; D.K., and A.G. wrote the manuscript; coordinator of the project, wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

References

1. Abebe F. Immunological basis of early clearance of Mycobacterium tuberculosis infection: the role of natural killer cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2021, vol. 204, no. 1, pp. 32–40. doi: 10.1111/cei.13565
2. Abreu M.T., Carvalheiro H., Rodrigues-Sousa T., Domingos A., Segorbe-Luis A., Rodrigues-Santos P., Souto-Carneiro M.M. Alterations in the peripheral blood B cell subpopulations of multidrug-resistant tuberculosis patients. *Clin. Exp. Med.*, 2014, vol. 14, pp. 423–429. doi: 10.1007/s10238-013-0258-1
3. Adamo S., Michler J., Zurbuchen Y., Cervia C., Taeschler P., Raeber M.E., Baghai Sain S., Nilsson J., Moor A.E., Boyman O. Signature of long-lived memory CD8+ T cells in acute SARS-CoV-2 infection. *Nature*, 2022, vol. 602, no. 7895, pp. 148–155. doi: 10.1038/s41586-021-04280-x
4. Ahmed A., Adiga V., Nayak S., Uday Kumar J.A.J., Dhar C., Sahoo P.N., Sundararaj B.K., Souza G.D., Vyakarnam A. Circulating HLA-DR+CD4+ effector memory T cells resistant to CCR5 and PD-L1 mediated suppression compromise regulatory T cell function in tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2018, vol. 14, no. 9: e1007289. doi: 10.1371/journal.ppat.1007289
5. Akiyama M., Yasuoka H., Yamaoka K., Suzuki K., Kaneko Y., Kondo H., Kassai Y., Koga K., Miyazaki T., Morita R., Yoshimura A., Takeuchi T. Enhanced IgG4 production by follicular helper 2 T cells and the involvement of follicular helper 1 T cells in the pathogenesis of IgG4-related disease. *Arthritis. Res. Ther.*, 2016, no. 18: 167. doi: 10.1186/s13075-016-1064-4
6. Akthivel P., Bruder D., Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2017, vol. 24, pp. 59–65. doi: 10.1097/MOH.0000000000000301
7. Al Balushi A., AlShekaili J., Al Kindi M., Ansari Z., Al-Khabori M., Khamis F., Ambusaidi Z., Al Balushi A., Al Huraizi A., Al Sulaimi S., Al Fahdi F., Al Balushi I., Pandak N., Fletcher T., Nasr I. Immunological predictors of disease severity in patients with COVID-19. *Int. J. Infect. Dis.*, 2021, vol. 110, pp. 83–92. doi: 10.1016/j.ijid.2021.06.056
8. Alosaimi B., Mubarak A., Hamed M.E., Almutairi A.Z., Alrashed A.A., AlJuryyan A., Enani M., Alenzi F.Q., Alturaiki W. Complement Anaphylatoxins and Inflammatory Cytokines as Prognostic Markers for COVID-19 Severity and In-Hospital Mortality. *Front. Immunol.*, 2021, no. 12: 668725. doi: 10.3389/fimmu.2021.668725
9. Annunziato F., Romagnani C., Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, vol. 135, no. 3, pp. 626–35. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.001
10. Bagavant H., Cizio K., Araszkievicz A.M., Papinska J.A., Garman L., Li C., Pezant N., Drake W.P., Montgomery C.G., Deshmukh U.S. Systemic immune response to vimentin and granuloma formation in a model of pulmonary sarcoidosis. *J. Transl. Autoimmun.*, 2022, no. 5: 100153. doi: 10.1016/j.jtauto.2022.100153
11. Belyaeva I.V., Kosova A.N., Vasiliev A.G. Tuberculosis and Autoimmunity. *Pathophysiology*, 2022, vol. 29, no. 3, pp. 469–470. doi: 10.3390/pathophysiology29020022
12. Billiau A., Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.*, 2001, vol. 70, no. 6, pp. 849–860
13. Billottet C., Quemener C., Bikfalvi A. CXCR3, a double-edged sword in tumor progression and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, vol. 1836, no. 2, pp. 287–295. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.08.002
14. Blank M., Barzilai O., Shoenfeld Y. Molecular mimicry and auto-immunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2007, vol. 32, no. 1, pp. 111–118. doi: 10.1007/BF02686087
15. Boechat J.L., Chora I., Morais A., Delgado L. The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology — current perspectives. *Pulmonology*, 2021, vol. 27, no. 5, pp. 423–437. doi: 10.1016/j.pulmoe.2021.03.008

16. Borham M., Oreiby A., El-Gedawy A., Hegazy Y., Khalifa H.O., Al-Gaabary M., Matsumoto T. Review on Bovine Tuberculosis: An Emerging Disease Associated with Multidrug-Resistant Mycobacterium Species. *Pathogens*, 2022, vol. 11, no. 7: 715. doi: 10.3390/pathogens11070715
17. Broos C.E., van Nimwegen M., Hoogsteden H.C., Hendriks R.W., Kool M., van den Blink B. Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis. *Front. Immunol.*, 2013, no. 4: 437. doi: 10.3389/fimmu.2013.00437
18. Broos C.E., van Nimwegen M., Kleinjan A., et al. Impaired survival of regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis. *Respir Res*. 2015, vol. 16, no. 1: 108. doi: 10.1186/s12931-015-0265-8
19. Busuttill A., Weigt S.S., Keane M.P., Xue Y.Y., Palchevskiy V., Burdick M.D., Huang C., Zisman D.A., Fishbein M., Lynch J.P.3rd, Strieter R.M., Elashoff R.M., Belperio J.A. CXCR3 ligands are augmented during the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. J.*, 2009, vol. 34, no. 3, pp. 676–686. doi: 10.1183/09031936.00157508
20. Cain H., Kraus B. Immunofluorescence microscopic demonstration of vimentin filaments in asteroid bodies of sarcoidosis. A comparison with electron microscopic findings. *Virchows Arch. B Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, 1983, vol. 42, no. 2, pp. 213–226. doi: 10.1007/bf02890384
21. Cardona P., Cardona P.-J. Regulatory T Cells in Mycobacterium tuberculosis Infection. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 10: 2139. doi: 10.3389/fimmu.2019.02139
22. Caso F., Costa L., Ruscitti P., Navarini L., Del Puente A., Giacomelli R., Scarpa R. Could Sars-coronavirus-2 trigger autoimmune and/or autoinflammatory mechanisms in genetically predisposed subjects? *Autoimmun. Rev.*, 2020, vol. 19, no. 5: 102524. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102524
23. Chen X., Huang J., Huang Y., Chen J., Huang Y., Jiang X., Shi Y. Characteristics of immune cells and cytokines in patients with coronavirus disease 2019 in Guangzhou, China. *Hum. Immunol.*, 2020, vol. 81, no. 12, pp. 702–708. doi: 10.1016/j.humimm.2020.08.006
24. Chen X., Zhang M., Liao M., Graner M.W., Wu C., Yang Q., Liu H., Zhou B. Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlates with IL-6R expression on CD4+ T Cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2010, vol. 181, no. 7, pp. 734–742. doi: 10.1164/rccm.200909-1463OC
25. Chen Y.C., Chin C.H., Liu S.F., Wu C.C., Tsen C.C., Wang Y.H., Chao T.Y., Lie C.H., Chen C.J., Wang C.C., Lin M.C. Prognostic values of serum IP-10 and IL-17 in patients with pulmonary tuberculosis. *Dis. Markers*, 2011, vol. 31, no. 2, pp. 101–110. doi: 10.3233/DMA-2011-0808
26. Cheng M.P., Butler-Laporte G., Parkes L.O., Bold T.D., Fritzler M.J., Behr M.A. Prevalence of Auto-antibodies in Pulmonary Tuberculosis. *Open Forum Infect. Dis.*, 2019, vol. 6, no. 4: ofz114. doi: 10.1093/ofid/ofz114
27. Chiacchio T., Casetti R., Butera O., Vanini V., Carrara S., Girardi E., Di Mitri D., Battistini L., Martini F., Borsellino G., Goletti D. Characterization of regulatory T cells identified as CD4(+)CD25(high)CD39(+) in patients with active tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2009, vol. 156, no. 3, pp. 463–70. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03908.x
28. Cinetto F., Scarpa R., Dell'Edera A., Jones M.G., Immunology of sarcoidosis: old companions, new relationships. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2020, vol. 26, pp. 535–543. doi: 10.1097/MCP.0000000000000711
29. D'Alessandro M., Bergantini L., Cameli P., Mezzasalma F., Refini R.M., Pieroni M., Sestini P., Bargagli E. Adaptive immune system in pulmonary sarcoidosis — comparison of peripheral and alveolar biomarkers. *Clin. Exp. Immunol.*, 2021, vol. 205, no. 3, pp. 406–416. doi: 10.1111/cei.13635
30. D'Alessandro M., Bergantini L., Gangi S., Cameli P., Armati M., Fanetti M., Mezzasalma F., Baglioni S., Sarc-Si Study Group, Bargagli E. Imbalance of Lymphocyte Subsets and CD45RA-Expressing Cells in Intrathoracic Lymph Nodes, Alveolar Compartment and Bloodstream of Pulmonary Sarcoidosis Patients. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, no. 12: 10344. doi: 10.3390/ijms241210344
31. De Biasi S., Lo Tartaro D., Meschiari M., Gibellini L., Bellinazzi C., Borella R., Fidanza L., Mattioli M., Paolini A., Gozzi L., Jaacoub D., Faltoni M., Volpi S., Milić J., Sita M., Sarti M., Pucillo C., Girardis M., Guaraldi G., Mussini C., Cossarizza A. Expansion of plasmablasts and loss of memory B cells in peripheral blood from COVID-19 patients with pneumonia. *Eur. J. Immunol.*, 2020, vol. 50, no. 9, pp. 1283–1294. doi: 10.1002/eji.202048838
32. Ding J., Dai J., Cai H., Gao Q., Wen Y. Extensively disturbance of regulatory T cells — Th17 cells balance in stage II pulmonary sarcoidosis. *Int. J. Med. Sci.*, 2017, vol. 14, no. 11, pp. 1136–1142. doi: 10.7150/ijms.18838
33. Dubaniewicz A. Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins and autoimmunity in sarcoidosis. *Autoimmun. Rev.*, 2010, vol. 9, no. 6, pp. 419–424. doi: 10.1016/j.autrev.2009.11.015
34. Elkington P., Tebruegge M., Mansour S. Tuberculosis: an Infection-Initiated Autoimmune Disease? *Trends Immunol.*, 2016, vol. 37, no. 12, pp. 815–818. doi: 10.1016/j.it.2016.09.007
35. Erre G.L., Cossu D., Masala S., Mameli G., Cadoni M.L., Serdino S., Longu M.G., Passiu G., Sechi L.A. Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan antibodies are associated to rheumatoid arthritis in Sardinian patients. *Clin. Rheumatol.*, 2014, vol. 33, no. 12, pp. 1725–1729. doi: 10.1007/s10067-014-2678-z
36. Fathi F., Sami R., Mozafarpour S., Hafezi H., Motedayyen H., Arefnezhad R., Eskandari N. Immune system changes during COVID-19 recovery play key role in determining disease severity. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2020, no. 34: 2058738420966497. doi: 10.1177/2058738420966497
37. Ferrantelli F., Chiozzini C., Manfredi F., Leone P., Spada M., Di Virgilio A., Giovannelli A., Sanchez M., Cara A., Michelini Z., Federico M. Strong SARS-CoV-2 N-Specific CD8+ T Immunity Induced by Engineered Extracellular Vesicles Associates with Protection from Lethal Infection in Mice. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 2: 329. doi: 10.3390/v14020329
38. Fischer A., Ellinghaus D., Nutsua M., Hofmann S., Montgomery C.G., Iannuzzi M.C., Rybicki B.A., Petrek M., Mrazek F., Pabst S., Grohé C., Grunewald J., Ronninger M., Eklund A., Padyukov L., Mihailovic-Vucinic V., Jovanovic D., Sterclova M., Homolka J., Nöthen M.M., Herms S., Gieger C., Strauch K., Winkelmann J., Boehm B.O., Brand S., Büning C., Schürmann M., Ellinghaus E., Baurecht H., Lieb W., Nebel A., Müller-Quernheim J., Franke A., Schreiber S.; GenPhenReSa Consortium. Identification of Immune-Relevant Factors Conferring Sarcoidosis Genetic Risk. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2015, vol. 192, no. 6, pp. 727–736. doi: 10.1164/rccm.201503-0418OC

39. Fischer A., Rybicki B.A. Granuloma genes in sarcoidosis: what is new? *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2015, vol. 21, no. 5, pp. 510–516. doi: 10.1097/MCP.0000000000000189
40. Gong F., Dai Y., Zheng T., Cheng L., Zhao D., Wang H., Liu M., Pei H., Jin T., Yu D., Zhou P. Peripheral CD4+ T cell subsets and antibody response in COVID-19 convalescent individuals. *J. Clin. Invest.*, 2020, vol. 130, no. 12, pp. 6588–6599. doi: 10.1172/JCI141054
41. Groom J.R., Luster A.D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell. Biol.*, 2011, vol. 89, no. 2, pp. 207–215. doi: 10.1038/icc.2010.158
42. Gutiérrez-Bautista J.F., Rodríguez-Nicolas A., Rosales-Castillo A., Jiménez P., Garrido F., Anderson P., Ruiz-Cabello F., López-Ruz M.Á. Negative Clinical Evolution in COVID-19 Patients Is Frequently Accompanied With an Increased Proportion of Undifferentiated Th Cells and a Strong Underrepresentation of the Th1 Subset. *Front. Immunol.*, 2020, no. 11: 596553. doi: 10.3389/fimmu.2020.596553
43. Guyot-Revoll V., Innes J.A., Hackforth S., Hinks T., Lalvani A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2006, vol. 173, pp. 803–810. doi: 10.1164/rccm.200508-1294OC
44. Habel J.R., Nguyen T.H.O., van de Sandt C.E., Juno J.A., Chaurasia P., Wragg K., Koutsakos M., Hensen L., Jia X., Chua B., Zhang W., Tan H.X., Flanagan K.L., Doolan D.L., Torresi J., Chen W., Wakim L.M., Cheng A.C., Doherty P.C., Petersen J., Rossjohn J., Wheatley A.K., Kent S.J., Rowntree L.C., Kedzierska K. Suboptimal SARS-CoV-2-specific CD8+ T cell response associated with the prominent HLA-A*02:01 phenotype. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2020, vol. 117, no. 39, pp. 24384–24391. doi: 10.1073/pnas.2015486117
45. Halim L., Romano M., McGregor R., Correa I., Pavlidis P., Grageda N., Hoong S.J., Yuksel M., Jassem W., Hannen R.F., Ong M., McKinney O., Hayee B., Karagiannis S.N., Powell N., Lechler R.I., Nova-Lamperti E., Lombardi G. An Atlas of Human Regulatory T Helper-like Cells Reveals Features of Th2-like Tregs that Support a Tumorigenic Environment. *Cell. Rep.*, 2017, vol. 20, no. 3, pp. 757–770. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.079
46. Hingley-Wilson S.M., Connell D., Pollock K., Hsu T., Tchilian E., Sykes A., Grass L., Potiphar L., Bremang S., Kon O.M., Jacobs W.R. Jr., Lalvani A. ESX1-dependent fractalkine mediates chemotaxis and Mycobacterium tuberculosis infection in humans. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2014, vol. 94, no. 3, pp. 262–270. doi: 10.1016/j.tube.2014.01.004
47. Hu B., Huang S., Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J. Med. Virol.*, 2021, vol. 93, no. 1, pp. 250–256. doi: 10.1002/jmv.26232
48. Huang H., Lu Z., Jiang C., Liu J., Wang Y., Xu Z. Imbalance between Th17 and regulatory T-Cells in sarcoidosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, no. 11, pp. 21463–21473. doi: 10.3390/ijms141121463
49. Joosten S.A., van Meijgaarden K.E., Del Nonno F., Baiocchi A., Petrone L., Vanini V., Smits H.H., Palmieri F., Goletti D., Ottenhoff T.H. Patients with Tuberculosis Have a Dysfunctional Circulating B-Cell Compartment, Which Normalizes following Successful Treatment. *PLoS Pathog.*, 2016, vol. 12, no. 6: e1005687. doi: 10.1371/journal.ppat.1005687
50. Kakumanu P., Yamagata H., Sobel E.S., Reeves W.H., Chan E.K., Satoh M. Patients with pulmonary tuberculosis are frequently positive for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, but their sera also react with unmodified arginine-containing peptide. *Arthritis Rheum.*, 2008, vol. 58, no. 6, pp. 1576–1581. doi: 10.1002/art.23514
51. Kalfaoglu B., Almeida-Santos J., Tye C.A., Satou Y., Ono M. T-Cell Hyperactivation and Paralysis in Severe COVID-19 Infection Revealed by Single-Cell Analysis. *Front. Immunol.*, 2020, no. 11: 589380. doi: 10.3389/fimmu.2020.589380
52. Kalinina O., Golovkin A., Zaikova E., Aquino A., Bezrukikh V., Melnik O., Vasileva E., Karonova T., Kudryavtsev I., Shlyakhto E. Cytokine Storm Signature in Patients with Moderate and Severe COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 16: 8879. doi: 10.3390/ijms23168879
53. Kanduc D., Shoenfeld Y. On the molecular determinants of the SARS-CoV-2 attack. *Clin. Immunol.*, 2020, no. 215: 108426. doi: 10.1016/j.clim.2020.108426
54. Kaneko N., Kuo H.H., Boucau J., Farmer J.R., Allard-Chamard H., Mahajan V.S., Piechocka-Trocha A., Lefteri K., Osborn M., Bals J., Bartsch Y.C., Bonheur N., Caradonna T.M., Chevalier J., Chowdhury F., Diefenbach T.J., Einkauf K., Fallon J., Feldman J., Finn K.K., Garcia-Broncano P., Hartana C.A., Hauser B.M., Jiang C., Kaplonek P., Karpell M., Koscher E.C., Lian X., Liu H., Liu J., Ly N.L., Michell A.R., Rassadkina Y., Seiger K., Sessa L., Shin S., Singh N., Sun W., Sun X., Ticheli H.J., Waring M.T., Zhu A.L., Alter G., Li J.Z., Lingwood D., Schmidt A.G., Lichterfeld M., Walker B.D., Yu X.G., Padera R.F. Jr., Pillai S.; Massachusetts Consortium on Pathogen Readiness Specimen Working Group. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. *Cell*, 2020, vol. 183, no. 1, pp. 143–157.e13. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.025
55. Kim S.H., Kim J., Jang J.Y., Noh H., Park J., Jeong H., Jeon D., Uhm C., Oh H., Cho K., Jeon Y., On D., Yoon S., Lim S.Y., Kim S.P., Lee Y.W., Jang H.J., Park I.H., Oh J., Seo J.S., Kim J.J., Seok S.H., Lee Y.J., Hong S.M., An S.H., Kim S.Y., Kim Y.B., Hwang J.Y., Lee H.J., Kim H.B., Choi K.S., Park J.W., Seo J.Y., Yun J.W., Shin J.S., Lee H.Y., Kim K., Lee D., Lee H., Nam K.T., Seong J.K. Mouse models of lung-specific SARS-CoV-2 infection with moderate pathological traits. *Front. Immunol.*, 2022, no. 13: 1055811. doi: 10.3389/fimmu.2022.1055811
56. Kita S., Tsuda T., Sugisaki K., Miyazaki E., Matsumoto T. Characterization of distribution of T lymphocyte subsets and activated T lymphocytes infiltrating into sarcoid lesions. *Intern. Med.*, 1995, vol. 34, no. 9, pp. 847–855. doi: 10.2169/internalmedicine.34.847
57. Korobova Z.R., Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Batsunov O.K., Dedkov V.G., Gladkikh A.S., Sharova A.A., Adish Z., Chernykh E.I., Kaschenko V.A., Ratnikov V.A., Gorelov V.P., Stanevich O.V., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Cytokine Profiling in Different SARS-CoV-2 Genetic Variants. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 22: 14146. doi: 10.3390/ijms232214146
58. Koutsakos M., Rowntree L.C., Hensen L., Chua B.Y., van de Sandt C.E., Habel J.R., Zhang W., Jia X., Kedzierski L., Ashhurst T.M., Putri G.H., Marsh-Wakefield F., Read M.N., Edwards D.N., Clemens E.B., Wong C.Y., Mordant F.L., Juno J.A., Amanat F., Audsley J., Holmes N.E., Gordon C.L., Smibert O.C., Trubiano J.A., Hughes C.M., Catton M., Denholm J.T., Tong S.Y.C., Doolan D.L., Kotsimbos T.C., Jackson D.C., Krammer F., Godfrey D.I., Chung A.W., King N.J.C., Lewin S.R., Wheatley A.K., Kent S.J., Subbarao K., McMahon J., Thevarajan I., Nguyen T.H.O., Cheng A.C., Kedzierska K. Integrated immune dynamics define correlates of COVID-19 severity and antibody responses. *Cell. Rep. Med.*, 2021, vol. 2, no. 3: 100208. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100208

59. Kozlov V.A., Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Kozlov I.G., Kudlay D.A., Prodeus A.P., Borisov, A.G. Clinical Immunology. *Krasnoyarsk: Polycor, Russia, 2020. 386 p. (In Russ.)*
60. Kozlov V.A., Tikhonova E.P., Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Andronova N.V., Anisimova E.N., Golovkin A.S., Demina D.V., Zdzitovetsky D. E., Kalinina Yu.S., Kasparov E.V., Kozlov I.G., Korsunsky I.A., Kudlay D.A., Kuzmina T.Yu., Minoranskaya N.S., Prodeus A.P., Starikova E.A., Cherdantsev D.V., Chesnokov A.B., Gear P.A., Borisov A.G. Clinical immunology. A practical guide for infectious disease specialists. *Krasnoyarsk: Polikor, 2021. 563 p. (In Russ.)*. doi: 10.17513/np.438
61. Kratzer B., Trapin D., Ettl P., Körmöczi U., Rottal A., Tuppy F., Feichter M., Gattlinger P., Borochova K., Dorofeeva Y., Tulaeva I., Weber M., Grabmeier-Pfistershammer K., Tauber P.A., Gerdov M., Mühl B., Perkmann T., Fae I., Wenda S., Führer H., Henning R., Valenta R., Pickl W.F. Immunological imprint of COVID-19 on human peripheral blood leukocyte populations. *Allergy, 2021, vol. 76, no. 3, pp. 751–765*. doi: 10.1111/all.14647
62. Kudryavtsev I., Rubinstein A., Golovkin A., Kalinina O., Vasilyev K., Rudenko L., Isakova-Sivak I. Dysregulated Immune Responses in SARS-CoV-2-Infected Patients: A Comprehensive Overview. *Viruses, 2022, vol. 14, no. 5: 1082*. doi: 10.3390/v14051082
63. Kudryavtsev I., Serebriakova M., Starshinova A., Zinchenko Y., Basantsova N., Malkova A., Soprun L., Churilov L.P., Toubi E., Yablonskiy P., Shoenfeld Y. Imbalance in B cell and T Follicular Helper Cell Subsets in Pulmonary Sarcoidosis. *Sci. Rep., 2020, vol. 10, no. 1: 1059*. doi: 10.1038/s41598-020-57741-0
64. Kudryavtsev I., Zinchenko Y., Starshinova A., Serebriakova M., Malkova A., Akisheva T., Kudlay D., Glushkova A., Yablonskiy P., Shoenfeld Y. Circulating Regulatory T Cell Subsets in Patients with Sarcoidosis. *Diagnostics (Basel), 2023, vol. 13, no. 8: 1378*. doi: 10.3390/diagnostics13081378
65. Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Khamitova I.V., Isakov D.V., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Alterations in B Cell and Follicular T-Helper Cell Subsets in Patients with Acute COVID-19 and COVID-19 Convalescents. *Curr. Issues Mol. Biol., 2021, vol. 44, no. 1, pp. 194–205*. doi: 10.3390/cimb44010014
66. Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Isakov D.V., Rubinstein A.A., Batsunov O.K., Khamitova I.V., Kuznetsova R.N., Savin T.V., Akisheva T.V., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Heterogenous CD8+ T Cell Maturation and ‘Polarization’ in Acute and Convalescent COVID-19 Patients. *Viruses, 2022, vol. 14, no. 9: 1906*. doi: 10.3390/v14091906
67. Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Baranova O.P., Golovkin A.S., Isakov D.V., Serebriakova M.K., Ses T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. CD39+ expression by regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis and Löfgren’s syndrome. *Medical Immunol. (Russia), 2019, vol. 21, no. 3, pp. 467–478*. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-467-478
68. Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Baranova O.P., Serebriakova M.K., Ses’ T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. Peripheral blood T helper cell subsets in Löfgren’s and non-Löfgren’s syndrome patients. *Medical Immunology (Russia), 2022, vol. 24, no. 3, pp. 573–586. (In Russ.)*. doi: 10.15789/1563-0625-PBT-2468
69. Kudryavtsev I.V., Serebriakova M.K., Starshinova A.A., Zinchenko Yu.S., Basantsova N.Yu., Belyaeva E.N., Pavlova M.V., Yablonskiy P.K. Altered peripheral blood Th17 and follicular T-helper subsets in patients with pulmonary tuberculosis. *Russian Journal of Infection and Immunity, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 304–314*. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-304-314
70. Kumar P., Saini S., Khan S., Surendra Lele S., Prabhakar B.S. Restoring self-tolerance in autoimmune diseases by enhancing regulatory T-cells. *Cell. Immunol., 2019, vol. 339, pp. 41–49*. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.09.008
71. Laing A.G., Lorenc A., Del Molino Del Barrio I., Das A., Fish M., Monin L., Muñoz-Ruiz M., McKenzie D.R., Hayday T.S., Francos-Quijorna I., Kamdar S., Joseph M., Davies D., Davis R., Jennings A., Zlatareva I., Vantourout P., Wu Y., Sofra V., Cano F., Greco M., Theodoridis E., Freedman J.D., Gee S., Chan J.N.E., Ryan S., Bugallo-Blanco E., Peterson P., Kisand K., Haljasmägi L., Chadli L., Moingeon P., Martinez L., Merrick B., Bisnauthsing K., Brooks K., Ibrahim M.A.A., Mason J., Lopez Gomez F., Babalola K., Abdul-Jawad S., Cason J., Mant C., Seow J., Graham C., Doores K.J., Di Rosa F., Edgeworth J., Shankar-Hari M., Hayday A.C. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat. Med., 2020, vol. 26, no. 10, pp. 1623–1635*. doi: 10.1038/s41591-020-1038-6
72. Lazareva N.M., Baranova O.P., Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Ses’ T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. CXCR3 chemokine receptor ligands in sarcoidosis. *Medical Immunology (Russia), 2021, vol. 23, no. 1, pp. 73–86. (In Russ.)*. doi: 10.15789/1563-0625-CCR-2181
73. Lazareva N.M., Baranova O.P., Kudryavtsev I.V., Isakov D.V., Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Ses’ T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. chemokines CCL17 and CCL22 in sarcoidosis. *Medical Immunology (Russia), 2021, vol. 23, no. 4, pp. 791–798. (In Russ.)*. doi: 10.15789/1563-0625-CCA-2340
74. Lazareva N., Kudryavtsev I., Baranova O., Serebriakova M., Ses’ T., Ilkovich M., Totolyan A. Peripheral blood cytotoxic T cells in patients with sarcoidosis. *Russian Journal of Immunology, 2018, vol. 12, no. 3, pp. 348–353*. doi: 10.31857/S102872210002408-3
75. Li Y., Wei C., Xu H., Jia J., Wei Z., Guo R., Jia Y., Wu Y., Li Y., Qi X., Li Z., Gao X. The Immunoregulation of Th17 in Host against Intracellular Bacterial Infection. *Mediators Inflamm., 2018, no. 2018: 6587296*. doi: 10.1155/2018/6587296
76. Lin L., Lu L., Cao W., Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection — a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg. Microbes Infect., 2020, vol. 9, pp. 727–732*. doi: 10.1080/22221751.2020.1746199
77. Linke M., Pham H.T., Katholnig K., Schnöller T., Miller A., Demel F., Schütz B., Rosner M., Kovacic B., Sukhbaatar N., Niederreiter B., Blüml S., Kuess P., Sexl V., Müller M., Mikula M., Weckwerth W., Haschemi A., Susani M., Hengstschläger M., Gambello M.J., Weichhart T. Chronic signaling via the metabolic checkpoint kinase mTORC1 induces macrophage granuloma formation and marks sarcoidosis progression. *Nat. Immunol., 2017, vol. 18, no. 3, pp. 293–302*. doi: 10.1038/ni.3655
78. Lo C.Y., Huang Y.C., Huang H.Y., Chung F.T., Lin C.W., Chung K.F., Wang C.H. Increased Th1 Cells with Disease Resolution of Active Pulmonary Tuberculosis in Non-Atopic Patients. *Biomedicines, 2021, vol. 9, no. 7: 724*. doi: 10.3390/biomedicines9070724
79. Ly N.T.M., Ueda-Hayakawa I., Nguyen C.T.H., Okamoto H. Exploring the imbalance of circulating follicular helper CD4+ T cells in sarcoidosis patients. *J. Dermatol. Sci., 2020, vol. 97, no. 3, pp. 216–224*. doi: 10.1016/j.jdermsci.2020.02.002

80. Lyadova I.V., Pantelev A.V. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. *Mediators Inflamm*, 2015, no. 2015: 854507. doi: 10.1155/2015/854507
81. Machado Ribeiro F., Goldenberg T. Mycobacteria and autoimmunity. *Lupus*, 2015, vol. 24, no. 4–5, pp. 374–381. doi: 10.1177/0961203314559634
82. Malkova A., Kudlay D., Kudryavtsev I., Starshinova A., Yablonskiy P., Shoenfeld Y. Immunogenetic Predictors of Severe COVID-19. *Vaccines (Basel)*, 2021, vol. 9, no. 3: 211. doi: 10.3390/vaccines9030211
83. Mani R., Gupta M., Malik A., Tandon R., Prasad R., Bhatnagar R., Banerjee N. Adjuvant Potential of Poly- α -l-Glutamine from the Cell Wall of Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.*, 2018, vol. 86, no. 10: pii: e00537-18. doi: 10.1128/IAI.00537-18
84. Martonik D., Parfieniuk-Kowerda A., Rogalska M., Flisiak R. The Role of Th17 Response in COVID-19. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 6: 1550. doi: 10.3390/cells10061550
85. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E., Greenplate A.R., Wu J.E., Alanio C., Oldridge D.A., Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., D'Andrea K., Manne S., Chen Z., Huang Y.J., Reilly J.P., Weisman A.R., Ittner C.A.G., Kuthuru O., Dougherty J., Nzingha K., Han N., Kim J., Pattekar A., Goodwin E.C., Anderson E.M., Weirick M.E., Gouma S., Arevalo C.P., Bolton M.J., Chen F., Lacey S.F., Hensley S.E., Apostolidis S., Huang A.C., Vella L.A.; UPenn COVID Processing Unit; Betts M.R., Meyer N.J., Wherry E.J. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals patient heterogeneity and distinct immunotypes with implications for therapeutic interventions. *bioRxiv*, 2020: 2020.05.20.106401 [Preprint]. doi: 10.1101/2020.05.20.106401
86. Mertz P., Jeannel J., Guffroy A., Lescuyer S., Korganow A.S., Rondeau-Lutz M., Weber J.C. Granulomatous manifestations associated with COVID19 infection: Is there a link between these two diseases? *Autoimmun Rev.*, 2021, vol. 20, no. 6: 102824. doi: 10.1016/j.autrev.2021.102824
87. Miyara M., Amoura Z., Parizot C., Badoual C., Dorgham K., Trad S., Kambouchner M., Valeyre D., Chapelon-Abric C., Debré P., Piette J.C., Gorochov G. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *J. Exp. Med.*, 2006, vol. 203, no. 2, pp. 359–370. doi: 10.1084/jem.20050648
88. Mohebbi S.R., Baghaei K., Rostami-Nejad M., Nazemalhosseini Mojarad E., Mirjalali H., Yadegar A., Asri N., Abdoulahi S., Assadzadeh Aghdaei H. Significant changes of CD4, FOXP3, CD25, and IL6 expression level in Iranian COVID-19 patients. *Gastroenterol. Hepatol. Bed. Bench.*, 2020, vol. 13, no. 4, pp. 388–392.
89. Musaelyan A., Lapin S., Nazarov V., Tkachenko O., Gilburd B., Mazing A., Mikhailova L., Shoenfeld Y. Vimentin as antigenic target in autoimmunity: a comprehensive review. *J. Autoimmun. Rev.*, 2018, vol. 17, no. 9, pp. 926–934. doi: 10.1016/j.autrev.2018.04.004
90. Nureki S., Miyazaki E., Ando M., Ueno T., Fukami T., Kumamoto T., Sugisaki K., Tsuda T. Circulating levels of both Th1 and Th2 chemokines are elevated in patients with sarcoidosis. *Respir. Med.*, 2008, vol. 102, no. 2, pp. 239–247. doi: 10.1016/j.rmed.2007.09.006
91. Odak I., Barros-Martins J., Bošnjak B., Stahl K., David S., Wiesner O., Busch M., Hoepfer M.M., Pink I., Welte T., Cornberg M., Stoll M., Goudeva L., Blasczyk R., Ganser A., Prinz I., Förster R., Koenecke C., Schultze-Florey C.R. Reappearance of effector T cells is associated with recovery from COVID-19. *EBioMedicine*, 2020, no. 57: 102885. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102885
92. Ogongo P., Tezera L.B., Ardain A., Nhamoyebonde S., Ramsuran D., Singh A., Ng'oepe A., Karim F., Naidoo T., Khan K., Dullabh K.J., Fehlings M., Lee B.H., Nardin A., Lindestam Arlehamn C.S., Sette A., Behar S.M., Steyn A.J., Madansein R., Kløverpris H.N., Elkington P.T., Leslie A. Tissue-resident-like CD4+ T cells secreting IL-17 control Mycobacterium tuberculosis in the human lung. *J. Clin. Invest.*, 2021, vol. 131, no. 10: e142014. doi: 10.1172/JCI142014
93. Okamoto Yoshida Y., Umemura M., Yahagi A., O'Brien R.L., Ikuta K., Kishihara K., Hara H., Nakae S., Iwakura Y., Matsuzaki G. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J. Immunol.*, 2010, vol. 184, no. 8, pp. 4414–4422. doi: 10.4049/jimmunol.0903332
94. Patterson K.C., Chen E.S. The Pathogenesis of Pulmonary Sarcoidosis and Implications for Treatment. *Lupus*, 2015, vol. 24, no. 4–5, pp. 374–381. doi: 10.1177/0961203314559634
95. Peng X., Ouyang J., Isnard S., Lin J., Fombuena B., Zhu B., Routy J.P. Sharing CD4+ T Cell Loss: When COVID-19 and HIV Collide on Immune System. *Front. Immunol.*, 2020, no. 11: 596631. doi: 10.3389/fimmu.2020.596631
96. Pérez-Gómez A., Gasca-Capote C., Vitallé J., Ostos F.J., Serna-Gallego A., Trujillo-Rodríguez M., Muñoz-Muela E., Giráldez-Pérez T., Praena-Segovia J., Navarro-Amuedo M.D., Paniagua-García M., García-Gutiérrez M., Aguilar-Guisado M., Rivas-Jeremías I., Jiménez-León M.R., Bachiller S., Fernández-Villar A., Pérez-González A., Gutiérrez-Valencia A., Rafii-El-Idrissi Benhnia M., Weiskopf D., Sette A., López-Cortés L.F., Poveda E., Ruiz-Mateos E.; Virgen del Rocío Hospital COVID-19 and COHVID-GS Working Teams. Deciphering the quality of SARS-CoV-2 specific T-cell response associated with disease severity, immune memory and heterologous response. *Clin. Transl. Med.*, 2022, vol. 12, no. 4: e802. doi: 10.1002/ctm2.802
97. Prasse A., Georges C.G., Biller H., Hamm H., Matthys H., Luttmann W., Virchow J.C. Jr. Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar CD4+ and CD8+ T cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2000, vol. 122, no. 2, pp. 241–248. doi: 10.1046/j.1365-2249.2000.01365.x
98. Radziszewska A., Moulder Z., Jury E.C., Ciurtin C. CD8+ T Cell Phenotype and Function in Childhood and Adult-Onset Connective Tissue Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 19: 11431. doi: 10.3390/ijms231911431
99. Ramasamy A., Wang C., Brode W.M., Verduzco-Gutierrez M., Melamed E. Immunologic and Autoimmune-Related Sequelae of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection: Clinical Symptoms and Mechanisms of Disease. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.*, 2023, vol. 34, no. 3, pp. 623–642. doi: 10.1016/j.pmr.2023.04.004
100. Ramstein J., Broos C.E., Simpson L.J., Ansel K.M., Sun S.A., Ho M.E., Woodruff P.G., Bhakta N.R., Christian L., Nguyen C.P., Antalek B.J., Benn B.S., Hendriks R.W., van den Blink B., Kool M., Koth L.L. IFN- γ -producing T-Helper 17.1 Cells are increased in sarcoidosis and are more prevalent than T-Helper type 1 Cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2016, vol. 193, no. 11, pp. 1281–1291.
101. Repac J., Mandić M., Lunić T., Božić B., Božić Nedeljković B. Mining the capacity of human-associated microorganisms to trigger rheumatoid arthritis-A systematic immunoinformatics analysis of T cell epitopes. *PLoS One*, 2021, vol. 16, no. 6: e0253918. doi: 10.1371/journal.pone.0253918

102. Richmond B.W., Ploetze K., Isom J., Chambers-Harris I., Braun N.A., Taylor T., Abraham S., Mageto Y., Culver D.A., Oswald-Richter K.A., Drake W.P. Sarcoidosis Th17 cells are ESAT-6 antigen specific but demonstrate reduced IFN- γ expression. *J. Clin. Immunol.*, 2013, vol. 33, no. 2, pp. 446–455. doi: 10.1007/s10875-012-9817-6
103. Rijnink W.F., Ottenhoff T.H., Joosten S.A. B-Cells and Antibodies as Contributors to Effector Immune Responses in Tuberculosis. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 640168. doi: 10.3389/fimmu.2021.640168
104. Rojas M., Herrán M., Ramírez-Santana C., Leung P.S.C., Anaya J.M., Ridgway W.M., Gershwin M.E. Molecular mimicry and autoimmunity in the time of COVID-19. *J. Autoimmun.*, 2023, no. 139: 103070. doi: 10.1016/j.jaut.2023.103070
105. Samuel C.E. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001, vol. 14, no. 4, pp. 778–809. doi: 10.1128/CMR.14.4.778-809.2001
106. San Segundo D., Arnáiz de Las Revillas F., Lamadrid-Perojo P., Comins-Boo A., González-Rico C., Alonso-Peña M., Irure-Ventura J., Olmos J.M., Fariñas M.C., López-Hoyos M. Innate and Adaptive Immune Assessment at Admission to Predict Clinical Outcome in COVID-19 Patients. *Biomedicines*, 2021, vol. 9, no. 8: 917. doi: 10.3390/biomedicines9080917
107. Saris A., Reijnders T.D.Y., Nossent E.J., Schuurman A.R., Verhoeff J., Asten S.V., Bontkes H., Blok S., Duitman J., Bogaard H.J., Heunks L., Lutter R., van der Poll T., Garcia Vallejo J.J.; ArtDECO consortium and the Amsterdam UMC COVID study group. Distinct cellular immune profiles in the airways and blood of critically ill patients with COVID-19. *Thorax*, 2021, vol. 76, no. 10, pp. 1010–1019. doi: 10.1136/thoraxjnl-2020-216256
108. Sattler A., Angermair S., Stockmann H., Heim K.M., Khadzhyrov D., Treskatsch S., Halleck F., Kreis M.E., Kotsch K. SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition. *J. Clin. Invest.*, 2020, vol. 130, no. 12, pp. 6477–6489. doi: 10.1172/JCI140965
109. Saussine A., Tazi A., Feuillet S., Rybojad M., Juillard C., Bergeron A., Dessirier V., Bouhidel F., Janin A., Bensussan A., Bagot M., Bouaziz J.D. Active chronic sarcoidosis is characterized by increased transitional blood B cells, increased IL-10-producing regulatory B cells and high BAFF levels. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 8: e43588. doi: 10.1371/journal.pone.0043588
110. Scadding J.G. Mycobacterium tuberculosis in the aetiology of sarcoidosis. *Br. Med. J.*, 1960, vol. 2, no. 5213, pp. 1617–1623.
111. Schultheiß C., Paschold L., Simnica D., Mohme M., Willscher E., von Wenserski L., Scholz R., Wieters I., Dahlke C., Tolosa E., Sedding D.G., Ciesek S., Addo M., Binder M. Next-Generation Sequencing of T and B Cell Receptor Repertoires from COVID-19 Patients Showed Signatures Associated with Severity of Disease. *Immunity*, 2020, vol. 53, no. 2, pp. 442–455.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2020.06.024
112. Sellares J., Strambu I., Crouser E.D., Freudenberg M.A., Gulati M., Hart S., Herzog E., Kolb M., Weichhart T., Drake W.P., Spitzer G., Singh N., Culver D.A. New advances in the development of sarcoidosis models: a synopsis of a symposium sponsored by the Foundation for Sarcoidosis Research. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung. Dis.*, 2018, vol. 35, no. 1, pp. 2–4. doi: 10.36141/svldl.v35i1.7032
113. Semple P.L., Binder A.B., Davids M., Maredza A., van Zyl-Smit R.N., Dheda K. Regulatory T cells attenuate mycobacterial stasis in alveolar and blood-derived macrophages from patients with tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2013, vol. 187, no. 11, pp. 1249–58. doi: 10.1164/rccm.201210-1934OC
114. Sève P., Pacheco Y., Durupt F., Jamilloux Y., Gerfaud-Valentin M., Isaac S., Boussel L., Calender A., Androdias G., Valeyre D., El Jammal T. Sarcoidosis: A Clinical Overview from Symptoms to Diagnosis. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 4: 766. doi: 10.3390/cells10040766
115. Sharma A., Balda S., Apreja M., Kataria K., Capalash N., Sharma P. COVID-19 Diagnosis: Current and Future Techniques. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, vol. 193 (Pt B), pp. 1835–1844. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.016
116. Sharp M., Mustafa A.M., Farah N., Bonham C.A. Interstitial Lung Disease and Sarcoidosis. *Clin. Chest Med.*, 2023, vol. 44, no. 3, pp. 575–584. doi: 10.1016/j.ccm.2023.06.003
117. Shoenfeld Y., Aron-Maor A., Tanai A., Ehrenfeld M. BCG and Autoimmunity: Another Two-Edged Sword. *J. Autoimmun.*, 2001, vol. 16, pp. 235–240. doi: 10.1006/jaut.2000.0494
118. Song Z., Marzilli L., Greenlee B.M., Chen E.S., Silver R.F., Askin F.B., Teirstein A.S., Zhang Y., Cotter R.J., Moller D.R. Mycobacterial catalase-peroxidase is a tissue antigen and target of the adaptive immune response in systemic sarcoidosis. *J. Exp. Med.*, 2005, vol. 201, pp. 755–776. doi: 10.1084/jem.20040429
119. Sosa-Hernández V.A., Torres-Ruiz J., Cervantes-Díaz R., Romero-Ramírez S., Páez-Franco J.C., Meza-Sánchez D.E., Juárez-Vega G., Pérez-Fragoso A., Ortiz-Navarrete V., Ponce-de-León A., Llorente L., Berrón-Ruiz L., Mejía-Domínguez N.R., Gómez-Martín D., Maravillas-Montero J.L. B Cell Subsets as Severity-Associated Signatures in COVID-19 Patients. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11: 611004. doi: 10.3389/fimmu.2020.611004
120. Spoerl S., Kremer A.N., Aigner M., Eisenhauer N., Koch P., Meretuk L., Löffler P., Tenbusch M., Maier C., Überla K., Heinzerling L., Frey B., Lutzny-Geier G., Winkler T.H., Krönke G., Vetter M., Bruns H., Neurath M.F., Mackensen A., Kremer A.E., Völkl S. Upregulation of CCR4 in activated CD8+ T cells indicates enhanced lung homing in patients with severe acute SARS-CoV-2 infection. *Eur. J. Immunol.*, 2021, vol. 51, no. 6, pp. 1436–1448. doi: 10.1002/eji.202049135
121. Starshinova A., Malkova A., Kudryavtsev I., Kudlay D., Zinchenko Y., Yablonskiy P. Tuberculosis and autoimmunity: common features. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2022, no. 134: 102202. doi: 10.1016/j.tube.2022.102202
122. Starshinova A., Zinchenko Y., Malkova A., Kudlay D., Kudryavtsev I., Yablonskiy P. Sarcoidosis and Autoimmune Inflammatory Syndrome Induced by Adjuvants. *Life (Basel)*, 2023, vol. 13, no. 4: 1047. doi: 10.3390/life13041047
123. Starshinova A.A., Malkova A.M., Basantsova N.Y., Zinchenko Y.S., Kudryavtsev I.V., Ershov G.A., Soprun L.A., Mayevskaya V.A., Churilov L.P., Yablonskiy P.K. Sarcoidosis as an Autoimmune Disease. *Front. Immunol.*, 2020, no. 10: 2933. doi: 10.3389/fimmu.2019.02933
124. Starshinova A.A., Malkova A.M., Zinchenko Yu.S., Basantsova N.Yu., Kudlay D.A. Autoimmune component in the etiology of sarcoidosis. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2020, vol. 98, no. 5, pp. 54–62. doi: 10.21292/2075-1230-2020-98-5-54-62
125. Starshinova A.A., Malkova A.M., Zinchenko Yu.S., Basantsova N.Yu., Pavlova M.V., Belyaeva E.N., Lapin S.V., Masing A.V., Surkova E.A., Yablonskiy P.K. Characteristics of autoimmune inflammation in patients with pulmonary tuberculosis. *Medical Immunology (Russia)*, 2019, vol. 21, no. 5, pp. 911–918. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-911-918

126. Szekanecz Z., Balog A., Constantin T., Czirják L., Géher P., Kovács L., Kumánovics G., Nagy G., Rákóczi É., Szamosi S., Szűcs G., Vályi-Nagy I. COVID-19: autoimmunity, multisystemic inflammation and autoimmune rheumatic patients. *Expert Rev. Mol. Med.*, 2022, vol. 24: e13. doi: 10.1017/erm.2022.10
127. Tan M., Liu Y., Zhou R., Deng X., Li F., Liang K., Shi Y. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. *Immunology*, 2020, vol. 160, no. 3, pp. 261–268. doi: 10.1111/imm.13223
128. Tana C., Cinetto F., Mantini C., Bernardinello N., Tana M., Ricci F., Ticinesi A., Meschi T., Scarpa R., Cipollone F., Giamberardino M.A., Spagnolo P. Sarcoidosis and COVID-19: At the Cross-Road between Immunopathology and Clinical Manifestation. *Biomedicines*, 2022, vol. 10, no. 10: 2525. doi: 10.3390/biomedicines10102525
129. Tchernev G., Ananiev J., Cardoso J.C., Wollina U., Verma S.B., Patterson J.W., Dourmishev L.A., Tronnier M., Okamoto H., Mizuno K., Kanazawa N., Gulubova M., Manolova I., Salaro C. Sarcoidosis and molecular mimicry — important etiopathogenetic aspects: current state and future directions. *Wien Klin. Wochenschr.*, 2012, vol. 124, no. 7–8, pp. 227–238. doi: 10.1007/s00508-012-0154-9
130. Ten Berge B., Paats M.S., Bergen I.M., van den Blink B., Hoogsteden H.C., Lambrecht B.N., Hendriks R.W., Kleinjan A. Increased IL-17A expression in granulomas and in circulating memory T cells in sarcoidosis. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, vol. 51, no. 1, pp. 37–46. doi: 10.1093/rheumatology/ker316
131. Thillai M., Eberhardt C., Lewin A.M., Potiphar L., Hingley-Wilson S., Sridhar S., Macintyre J., Kon O.M., Wickremasinghe M., Wells A., Weeks M.E., Mitchell D., Lalvani A. Sarcoidosis and tuberculosis cytokine profiles: Indistinguishable in bronchoalveolar lavage but different in blood. *PLoS One*, 2012, vol. 7: e38083. doi: 10.1371/journal.pone.0038083
132. Trougakos I.P., Stamatelopoulos K., Terpos E., Tsitsilonis O.E., Aivalioti E., Paraskevis D., Kastiris E., Pavlakis G.N., Dimopoulos M.A. Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. *J. Biomed. Sci.*, 2021, vol. 28, no. 1: 9. doi: 10.1186/s12929-020-00703-5
133. Vasileva E.V., Kudryavtsev I.V., Maximov G.V., Verbov V.N., Serebriakova M.K., Tkachuk A.P., Totolian Areg A. Impact of HIV infection and tuberculosis on the peripheral blood T-cell differentiation. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 151–161. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-151-161
134. Velounias R.L., Tull T.J. Human B-cell subset identification and changes in inflammatory diseases. *Clin. Exp. Immunol.*, 2022, vol. 210, no. 3, pp. 201–216. doi: 10.1093/cei/uxac104
135. Watad A., Rosenberg V., Tiosano S., Cohen Tervaert J.W., Yavne Y., Shoenfeld Y., Shalev V., Chodick G., Amital H. Silicone breast implants and the risk of autoimmune diseases: real world analysis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2018, vol. 77, pp. 1191–1192. doi: 10.1093/ije/dyy217
136. Weiskopf D., Schmitz K.S., Raadsen M.P., Grifoni A., Okba N.M.A., Endeman H., van den Akker J.P.C., Molenkamp R., Koopmans M.P.G., van Gorp E.C.M., Haagmans B.L., de Swart R.L., Sette A., de Vries R.D. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci. Immunol.*, 2020, vol. 5, no. 48: eabd2071. doi: 10.1126/sciimmunol.abd2071
137. WHO global lists of high burden countries for TB, multidrug/rifampicin-resistant TB (MDR/RR-TB) and TB/HIV, 2021–2025. *WHO*, 2021. 16 p.
138. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) Pandemic. Geneva: WHO; 2020. URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
139. Winau F., Weber S., Sad S., de Diego J., Hoops S.L., Breiden B., Sandhoff K., Brinkmann V., Kaufmann S.H., Schaible U.E. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity*, 2006, vol. 24, no. 1, pp. 105–117. doi: 10.1016/j.immuni.2005.12.001
140. Winheim E., Rinke L., Lutz K., Reischer A., Leutbecher A., Wolfram L., Rausch L., Kranich J., Wratil P.R., Huber J.E., Baumjohann D., Rothenfusser S., Schubert B., Hilgendorff A., Hellmuth J.C., Scherer C., Muenchhoff M., von Bergwelt-Baildon M., Stark K., Straub T., Brocker T., Keppler O.T., Subklewe M., Krug A.B. Impaired function and delayed regeneration of dendritic cells in COVID-19. *PLoS Pathog.*, 2021, vol. 17, no. 10: e1009742. doi: 10.1371/journal.ppat.100974
141. Wu D., Yang X.O. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: an emerging target of JAK2 inhibitor Fedratinib. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2020, vol. 53, no. 3, pp. 368–370. doi: 10.1016/j.jmii.2020.03.005
142. Wu Y.E., Zhang S.W., Peng W.G., Li K.S., Li K., Jiang J.K., Lin J.H., Cai Y.M. Changes in lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with active pulmonary tuberculosis. *J. Int. Med. Res.*, 2009, vol. 37, no. 6, pp. 1742–1749. doi: 10.1177/147323000903700610
143. Xu Z., Shi L., Wang Y., Zhang J., Huang L., Zhang C., Liu S., Zhao P., Liu H., Zhu L., Tai Y., Bai C., Gao T., Song J., Xia P., Dong J., Zhao J., Wang F.S. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.*, 2020, vol. 8, pp. 420–422. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X
144. Zaid Y., Doré É., Dubuc I., Archambault A.S., Flamand O., Laviolette M., Flamand N., Boilard É., Flamand L. Chemokines and eicosanoids fuel the hyperinflammation within the lungs of patients with severe COVID-19. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, vol. 148, no. 2, pp. 368–380.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2021.05.032
145. Zewdie M., Howe R., Hoff S.T., Doherty T.M., Getachew N., Tarekegne A., Tessema B., Yamuah L., Aseffa A., Abebe M. Ex-vivo characterization of regulatory T cells in pulmonary tuberculosis patients, latently infected persons, and healthy endemic controls. *Tuberculosis*, 2016, vol. 100, pp. 61–68. doi: 10.1016/j.tube.2016.06.007
146. Zhang H., Costabel U., Dai H. The Role of Diverse Immune Cells in Sarcoidosis. *Front. Immunol.*, 2021, no. 12: 788502. doi: 10.3389/fimmu.2021.788502
147. Zhang M., Zhang S. T Cells in Fibrosis and Fibrotic Diseases. *Front. Immunol.*, 2020, no. 11: 1142. doi: 10.3389/fimmu.2020.01142
148. Zhang M., Zheng X., Zhang J., Zhu Y., Zhu X., Liu H., Zeng M., Graner M.W., Zhou B., Chen X. CD19+CD1d+CD5+ B cell frequencies are increased in patients with tuberculosis and suppress Th17 responses. *Cell. Immunol.*, 2012, vol. 274, no. 1–2, pp. 89–97. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.01.007
149. Zheng H.Y., Zhang M., Yang C.X., Zhang N., Wang X.C., Yang X.P., Dong X.Q., Zheng Y.T. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, vol. 17, no. 5, pp. 541–543. doi: 10.1038/s41423-020-0401-3

150. Zhou E.R., Arce S. Key Players and Biomarkers of the Adaptive Immune System in the Pathogenesis of Sarcoidosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 19: 7398. doi: 10.3390/ijms21197398
151. Zhuang Z., Lai X., Sun J., Chen Z., Zhang Z., Dai J., Liu D., Li Y., Li F., Wang Y., Zhu A., Wang J., Yang W., Huang J., Li X., Hu L., Wen L., Zhuo J., Zhang Y., Chen D., Li S., Huang S., Shi Y., Zheng K., Zhong N., Zhao J., Zhou D., Zhao J. Mapping and role of T cell response in SARS-CoV-2-infected mice. *J. Exp. Med.*, 2021, vol. 218, no. 4: e20202187. doi: 10.1084/jem.20202187

Авторы:

Старшинова А.А., д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории вероятностных методов анализа математического факультета ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; начальник Управления научными исследованиями ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени Алмазова, Санкт-Петербург, Россия;

Кудрявцев И.В., к.б.н., зав. лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Рубинштейн А.А., младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Малкова А., аспирант кафедры молекулярной биологии факультета естественных наук Университета Ариэль, г. Ариэль, Израиль;

Лин Х., д.м.н., кафедра микробиологии, иммунологии; ключевая лаборатория инфекций и иммунитета провинции Хэйлунцзян; ключевая лаборатория биологии патогенов, Харбинский медицинский университет, г. Харбин, Китай;

Чжуан М., д.м.н., кафедра микробиологии, иммунологии; ключевая лаборатория инфекций и иммунитета провинции Хэйлунцзян; ключевая лаборатория биологии патогенов, Харбинский медицинский университет, г. Харбин, Китай;

Старшинова А.Ю., студент медицинского факультета ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия;

Довгалюк И.Ф., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник, зав. отделением детского туберкулеза ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт физиопульмонологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия;

Кудлай Д.А., д.м.н., профессор кафедры фармакологии Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины и молекулярной иммунологии ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия.

Authors:

Starshinova A.A., DSc (Medicine), Head Researcher, Laboratory of Probabilistic Methods of Analysis, Mathematics Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Research Department, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation;

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head of the Cell Immunology Laboratory, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Rubinstein A.A., Junior Researcher, Cell Immunology Laboratory, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Malkova A., PhD Student, Department of Molecular Biology, Ariel University Faculty of Natural Sciences, Ariel, Israel;

Ling H., DSc (Medicine), Department of Microbiology, Immunology, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Infection and Immunity, Key Laboratory of Pathogen Biology, Harbin Medical University, Harbin, China;

Zhuang M., DSc (Medicine), Department of Microbiology, Immunology, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Infection and Immunity, Key Laboratory of Pathogen Biology, Harbin Medical University, Harbin, China;

Starshinova A.Yu., Student of Medicine Department, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Dovgaluk I.F., DSc (Medicine), Professor, Leading Researcher, Head of Pediatric Tuberculosis Department, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

Kudlay D.A., DSc (Medicine), Professor of Pharmacology Department, Institute of Pharmacy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Leading Researcher, Laboratory of Personalized Medicine and Molecular Immunology, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation.

ИММУННЫЙ СТАТУС ПАЦИЕНТОВ С ВНЕБОЛЬНИЧНЫМИ ПНЕВМОНИЯМИ, АССОЦИИРОВАННЫМИ С НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ И ДРУГИМИ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ

И.А. Иванова¹, А.В. Филиппенко¹, Н.В. Павлович¹, Н.В. Аронова¹, М.В. Цимбалистова¹,
А.С. Анисимова¹, Н.Д. Омельченко¹, А.А. Труфанова¹, О.С. Чемисова², **А.К. Носков¹**

¹ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

² Донской государственный технический университет, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Несмотря на то что в развитии внебольничной пневмонии важную роль играет состояние иммунной системы индивидуума, клинические особенности заболевания определяются не только особенностями иммунного ответа, но и характером инфекционного агента. Целью работы являлась оценка иммунного статуса пациентов с внебольничными пневмониями с поражением легких от 2 до 12%, у которых верифицированы возбудители вирусной, бактериальной и грибковой природы ($n = 96$, в возрасте $46,3 \pm 20,5$), попавшие в стационар через 5–7 суток после начала заболевания. *Материалы и методы.* Отбор мазков и мокроты проводили в первые сутки после поступления. Наличие возбудителя COVID-19 определяли в мазках методом ПЦР, используя набор Вектор-ПЦРв-2019-nCoV-RG (ГНЦ Вектор Роспотребнадзора, Россия). Также оценивали биохимическую активность, морфологию колоний, концентрацию патогенов (в количестве $\geq 10^5$ КОЕ/мл). По результатам предварительных исследований были сформированы целевые группы пациентов: с новой коронавирусной инфекцией, обусловленной геновариантом SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Омикрон) ($n = 33$); с COVID-19 и возбудителями бактериальной природы ($n = 17$); с COVID-19 и сочетанной бактериальной и грибковой инфекцией ($n = 16$); больные, у которых идентифицированы возбудители бактериальных инфекций ($n = 13$); больные с сочетанной бактериальной и грибковой инфекцией ($n = 17$). У всех волонтеров определяли относительное и абсолютное содержание CD45⁺CD3⁺ лимфоцитов, CD45⁺CD3⁺CD4⁺ клеток, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺ клеток, CD45⁺CD3⁻CD16⁻CD56⁺ лимфоцитов, CD45⁺CD45RO⁻CD45RA⁺ и CD45⁺CD45RO⁺CD45RA⁻ лимфоцитов, CD45⁺CD19⁺ клеток, CD45⁺CD5⁺CD19⁻CD27⁻ и CD45⁺CD19⁺CD5⁻CD27⁻ лимфоцитов, CD45⁺CD19⁺CD5⁻CD27⁺ клеток. *Результаты.* При анализе иммунного статуса пациентов с внебольничными пневмониями, ассоциированными с возбудителем новой коронавирусной инфекции геноварианта Омикрон, выявлено наличие Т-лимфоцитопении, снижение числа CD8⁺ лимфоцитов, увеличение относительного и абсолютного количества НК-клеток. У больных COVID-19, у которых были также верифицированы возбудители бактериальной природы, наблюдалось уменьшение относительного и абсолютного количества Т-хелперов, повышение относительного и абсолютного числа В- и В2-лимфоцитов. У COVID-19-негативных волонтеров с внебольничными пневмониями

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Для цитирования:

Иванова И.А., Филиппенко А.В., Павлович Н.В., Аронова Н.В.,
Цимбалистова М.В., Анисимова А.С., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А.,
Чемисова О.С., Носков А.К. Иммунный статус пациентов с внебольничными
пневмониями, ассоциированными с новой коронавирусной инфекцией
и другими возбудителями // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2.
С. 267–276. doi: 10.15789/2220-7619-ISO-17589

Citation:

Ivanova I.A., Filippenko A.V., Pavlovich N.V., Aronova N.V., Tsimbalistova M.V.,
Anisimova A.S., Omelchenko N.D., Trufanova A.A., Chemisova O.S., Noskov A.K.
Immune status of patients with community-acquired pneumonia associated with
a new coronavirus infection and other viral and bacterial pathogens // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2,
pp. 267–276. doi: 10.15789/2220-7619-ISO-17589

ми бактериальной и бактериально-грибковой природы было увеличено относительное и абсолютное содержание В- и В2-лимфоцитов, а также общей популяции В-клеток памяти. В отличие от COVID-19-позитивных, у пациентов этих групп регистрировалось, при отсутствии Т-лимфоцитопении, снижение числа CD4⁺ клеток и увеличение количества цитотоксических лимфоцитов. **Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что в иммунном статусе пациентов с внебольничными пневмониями, в зависимости от природы инфекционного агента, регистрируются изменения в относительном и абсолютном содержании Т-хелперов, цитотоксических лимфоцитов, а также в качественном и количественном составе популяции В-лимфоцитов.

Ключевые слова: COVID-19, внебольничная пневмония, иммунный статус, популяции Т-лимфоцитов, В-лимфоциты.

IMMUNE STATUS OF PATIENTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA ASSOCIATED WITH A NEW CORONAVIRUS INFECTION AND OTHER VIRAL AND BACTERIAL PATHOGENS

Ivanova I.A., Filippenko A.V., Pavlovich N.V., Aronova N.V., Tsimbalistova M.V., Anisimova A.S., Omelchenko N.D., Trufanova A.A., Chemisova O.S.^b, Noskov A.K.^a

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

^b Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Despite the fact that the state of the individual's immune system plays an important role in developing community-acquired pneumonia, its clinical features are determined not only by immune response characteristics, but also by the nature of the infectious agent. The aim of the work was to assess immune status of patients with community-acquired pneumonia with lung damage ranging from 2 to 12%, in whom pathogens of a viral, bacterial and fungal nature were verified (n = 96, aged 46,3±20,5) who were admitted to the hospital 5–7 days after disease onset. **Materials and methods.** The selection of smears and sputum specimens was carried out on day 1 after admission. COVID-19 pathogen was analyzed in smears by PCR using the Vector-PCRR-2019-nCoV-RG kit (SSC Vector of Rospotrebnadzor, Russia). Biochemical activity, colony morphology, and pathogen concentration (in the amount of ≥ 10⁵ CFU/ml) were also evaluated. Based on the results of preliminary studies, target patients groups were formed: with a new coronavirus infection caused by the SARS-CoV-2 gene variant B.1.1.529 (Omicron) (n = 33); with COVID-19 and bacterial pathogens (n = 17); with COVID-19 and combined bacterial and fungal infection (n = 16); patients with identified pathogens of bacterial infections (n = 13); patients with combined bacterial and fungal infection (n = 17). The relative and absolute level of CD45⁺CD3⁺ lymphocytes, CD45⁺CD3⁺CD4⁺ cells, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ lymphocytes, CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺ cells, CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺ lymphocytes, CD45⁺CD45RO⁺CD45RA⁺ and CD45⁺CD45RO⁺CD45RA⁻ lymphocytes, CD45⁺CD19⁺ cells, CD45⁺CD5⁺CD19⁻CD27⁻ and CD45⁺CD19⁺CD5⁻CD27⁻ lymphocytes, CD45⁺CD19⁺CD5⁻CD27⁺ cells was assessed in all volunteers. **Results.** The analysis of the immune status of patients with community-acquired pneumonia associated with Omicron gene variant new coronavirus infection revealed T-lymphocytopenia, a decreased number of CD8⁺ lymphocytes, an increased relative and absolute number of NK cells. In COVID-19 patients, who also had bacterial pathogens verified, there was a decrease in relative and absolute number of T-helper cells, an increased relative and absolute number of B and B2 lymphocytes. In COVID-19-negative volunteers with bacterial and bacterial-fungal community-acquired pneumonia, the relative and absolute level of B and B2 lymphocytes, as well as the general memory B cell population, was increased. In contrast to COVID-19-positive patients, in the absence of T-lymphocytopenia, a decreased number of CD4⁺ cells and rise in number of cytotoxic lymphocytes were recorded in patients of these groups. **Conclusions.** The data obtained indicate that in the immune status of patients with community-acquired pneumonia, depending on the nature of the infectious agent, changes in relative and absolute level of T-helper cells, cytotoxic lymphocytes, as well as in the qualitative and quantitative B-lymphocyte population composition are recorded.

Key words: COVID-19, community-acquired pneumonia, immune status, population of T-lymphocytes, B-lymphocytes.

Введение

Иммунная система играет важную роль при внебольничных пневмониях (ВП) различной этиологии [1, 10, 18]. Неблагоприятное течение этого заболевания связано с развитием у пациентов различных нарушений функциональной активности иммунокомпетентных клеток, формирования иммунного ответа на возбудитель, а также его регуляции [7].

Отмечено, что в острый период внебольничных пневмоний иммунный ответ, как систем-

ный, так и местный, характеризуется развитием вторичной иммунной недостаточности, которая выражается в снижении рецепторной активности CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ лимфоцитов в периферической крови и CD11b⁺, CD18⁺, CD4⁺, CD16⁺, CD25⁺, HLA-DR⁺ клеток в индукционной мокроте. При затяжном течении инфекции наблюдаются нарушения в различных звеньях иммунной системы. Выявлено уменьшение уровня CD3⁺- и CD19⁺-лимфоцитов, изменение их функциональных характеристик, дисбаланс в соотношении популяций лимфоцитов и имму-

ноглобулинов [9]. При тяжелом течении внебольничных пневмоний регистрируется снижение функциональной активности фагоцитарного звена, Т-эффекторных клеток при повышенной реакции натуральных киллеров, нарушение элиминации иммунных комплексов, дисбаланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами, дефицит гуморальных факторов: В-лимфоцитов и иммуноглобулинов М и G [6]. Также при пневмониях присутствует выраженный Т-клеточный иммунодефицит, характеризующийся снижением общих циркулирующих Т-лимфоцитов, NK-клеток, CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов [3]. Все вышеперечисленное способствует более длительному и тяжелому течению заболевания и снижению эффективности проводимого лечения.

При инфекционном поражении легких развиваются разнонаправленные системные и местные иммунные реакции. На системном уровне отмечаются снижение количества и функциональной активности Т- и В-лимфоцитов, что приводит к дисбалансу в соотношении популяций лимфоцитов и иммуноглобулинов. На местном уровне, напротив, активируются механизмы иммунной защиты за счет инфильтрации лимфоцитами и плазмочитами [7].

В период пандемии COVID-19 было отмечено значительное увеличение количества больных внебольничными пневмониями. SARS-CoV-2 способен вызывать многочисленные патологические изменения в иммунной системе, такие как нейтрофилия, выраженная лимфоцитопения [14], нарушения функциональной активности популяций лимфоцитов, имеющих решающее значение в элиминации возбудителей внутриклеточных инфекций [12, 17], вызывая дисфункцию в работе иммунной системы [20] и делая больных ВП уязвимыми к вторичным инфекциям вирусной и бактериальной природы.

У больных тяжелой формой COVID-19 были снижены уровни лимфоцитов, повышены лейкоциты, нейтрофилы, тромбоциты, С-реактивный белок, нарушены соотношения лимфоцитов, тромбоцитов к лимфоцитам [21].

Показано, что пневмония у больных COVID-19 отличается от SARS-CoV-2-негативной внебольничной пневмонии [21]. У пациентов с COVID-19, в отличие от внебольничных пневмоний другой этиологии, были снижены количественные показатели лейкоцитов и лимфоцитов [2]. Также выявлено, что кроме наиболее выраженной лимфоцитопении, у больных COVID-19 наблюдалось увеличение числа Т-хелперов и NK-клеток, в то время как уровни TNF α и IFN γ были понижены по сравнению с таковыми у пациентов с внебольничными пневмониями, ассоциированными с другими возбудителями [15].

Известно, что очень часто течение пневмонии у пациентов с COVID-19 отягощается присутствием сопутствующей и вторичной инфекции вирусной или бактериальной этиологии [19]. В зарубежной и отечественной печати опубликованы единичные работы, посвященные изучению качественного и количественного состава популяций лимфоцитов у больных пневмониями, вызванными возбудителями вирусной и бактериальной природы в период пандемии новой коронавирусной инфекции, поэтому изучение иммунного статуса COVID-19-позитивных и COVID-19-негативных пациентов, заболевание которых также ассоциировано с другими возбудителями является актуальной задачей.

Целью нашей работы была оценка иммунного статуса больных внебольничными пневмониями смешанной этиологии на фоне распространения геноварианта SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Омикрон).

Материалы и методы

В исследовании приняли участие больные внебольничными пневмониями, попавшие в стационар через 5–7 суток после начала заболевания. Отбор проб (мазки и мокроту) проводили в первые сутки после поступления в больницу. Наличие возбудителя COVID-19 определяли в мазках методом ПЦР, используя набор Вектор-ПЦРrv-2019-nCoV-RG (ГНЦ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия).

Бактериологические исследования осуществляли согласно действующим документам [8]. Оценивали биохимическую активность, морфологию колоний, концентрацию патогенов (в количестве $\geq 10^5$ КОЕ/мл). Идентифицировали микроорганизмы с помощью прибора Autoflex (Bruker Daltonics, Германия), используя программное обеспечение BioType 3.0.

В результате у пациентов с ВП были выявлены возбудители бактериальной (грамположительные кокки, бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, неферментирующие грамотрицательные бактерии), вирусной (SARS-CoV-2) и грибковой (род *Candida*) природы.

С целью исключения из исследования тех, кто ранее уже перенес SARS-CoV-2, либо был привит противокоронавирусными вакцинами, в сыворотках крови пациентов определяли наличие антител класса G к S-белку возбудителя COVID-19, используя набор «ИФА-анти-SARS-CoV-2-IgG» (АО «Вектор-Бест», Россия).

Таким образом, после проведенных предварительных этапов для участия в эксперименте были отобраны 96 человек (55 женщин, 41 мужчина) в возрасте $46,3 \pm 20,5$ лет. Поражение легких у этих пациентов согласно КТ составляло от 2 до 12%.

Для проведения дальнейших исследований были сформированы целевые группы:

- пациенты с новой коронавирусной инфекцией — 33 человека (18 женщин и 15 мужчин);
- пациенты с COVID-19, у которых выявлены возбудители бактериальных инфекций — 17 человек (7 женщин и 10 мужчин);
- COVID-19-позитивные пациенты, у которых выявлено наличие сочетанной бактериальной и грибковой инфекций — 16 человек (8 женщин и 8 мужчин);
- COVID-19-негативные больные, у которых идентифицированы возбудители бактериальных инфекций — 13 человек (7 женщин и 6 мужчин);
- COVID-19-негативные больные с сочетанной бактериальной и грибковой инфекцией 17 человек (7 женщин и 10 мужчин).

В контрольную группу входили 8 женщин (35,5±3,46 лет) без признаков респираторного заболевания, с отрицательным ПЦР-тестом на SARS-CoV-2 и отсутствием специфических к SARS-CoV-2 антител.

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

Забор крови осуществляли натощак утром из локтевой вены в пробирку VACUTAINER (BD) с динатриевой солью ЭДТА.

Для расчета относительного содержания клеток кровь лизировали OPTILYSE C (Beckman Coulter, США), окрашивали моноклональными антителами (Beckman Coulter, США) и цитофлуориметрировали на приборе «Navios™» (Beckman Coulter, США), подсчитывая не менее 10 тыс. событий.

Определяли относительное и абсолютное содержание CD45⁺CD3⁺ лимфоцитов, CD45⁺CD3⁺CD4⁺ клеток, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺ клеток, CD45⁺CD3⁺CD16⁻CD56⁺ лимфоцитов, CD45⁺CD45RO⁻CD45RA⁺ и CD45⁺CD45RO⁺CD45RA⁻ лимфоцитов, CD45⁺CD19⁺ клеток, CD45⁺CD5⁺CD19⁻CD27⁻ и CD45⁺CD19⁺CD5⁻CD27⁻ лимфоцитов, CD45⁺CD19⁺CD5⁻CD27⁺ клеток.

Общее число лейкоцитов (WBC) рассчитывали по формуле:

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

где а — лейкоциты, посчитанные в камере Горяева.

Абсолютное число клеток — по формуле:

$$WBC \times (\%) / 100.$$

Таблица 1. Относительное (%) содержание основных популяций и субпопуляций Т-лимфоцитов у пациентов с внебольничными пневмониями

Table 1. Relative (%) level of major T-lymphocyte populations and subsets in patients with community-acquired pneumonia

Популяции и субпопуляции лимфоцитов периферической крови Populations and subpopulations of peripheral blood lymphocytes	Контрольная группа Control group	Группы пациентов Patient groups		
		SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 бактерии SARS-CoV-2 bacteria	SARS-CoV-2 бактерии грибы SARS-CoV-2 bacteria fungi
Т-лимфоциты (CD45⁺CD3⁺) T-lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺)	63,7±2,3	55,2±2,5*	52,4±4,5*	56,5±2,9*
Т-хелперы (CD45⁺CD3⁺CD4⁺) T-helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺)	42,6±2,2	36,7±2,3	26,5±2,9*,**	27,8±2,7*,**
Цитотоксические лимфоциты (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) Cytotoxic lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺)	22,3±2,2	16,1±2,3*	26,0±3,1**	28,3±2,8**
НК-клетки (CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺) NK cells (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	8,5±2,14	14,8±2,0*	9,1±3,6	12,6±2,8
ТНК-клетки (CD45⁺CD3⁺CD16⁻CD56⁺) TNK cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁻ CD56 ⁺)	5,7±1,5	3,8±1,1	3,3±1,0	3,6±1,1
Наивные Т-лимфоциты (CD45⁺CD45RO⁻CD45RA⁺) Naive T-lymphocytes (CD45 ⁺ CD45RO ⁻ CD45RA ⁺)	38,2±3,2	55,2±2,4*	48,1±2,2	48,8±2,1
Активированные/памяти Т-лимфоциты (CD45⁺CD45RO⁺CD45RA⁻) Activated/memory T-lymphocytes (CD45 ⁺ CD45RO ⁺ CD45RA ⁻)	22,4±2,2	23,8±4,0	35,7±4,7*	38,0±2,7*

Примечание. * — достоверное отличие от контрольной группы (p < 0,05); ** — достоверное отличие от группы пациентов с SARS-CoV-2 (p < 0,05).
Note. * — significant difference compared to control group (p < 0.05). ** — significant difference compared to patients with SARS-CoV-2 (p < 0.05).

Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007). Вычисляли среднее арифметическое значение \pm стандартное квадратичное отклонение. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали, используя непараметрический критерий Манна–Уитни. Проводили сравнение совокупностей по качественным признакам с помощью критерия Фишера. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Нами проведена сравнительная оценка иммунного статуса пациентов с COVID-19, а также больных, у которых новая коронавирусная инфекция была отягощена присоединившейся бактериальной, либо бактериально-грибковой микрофлорой.

Выявлено, что у COVID-19-позитивных пациентов, инфицированных штаммом Омикрон, наблюдается Т-лимфоцитопения, обусловленная пониженным относительным и абсолютным содержанием CD8⁺лимфоцитов (табл. 1, 2).

В отличие от этой группы, у волонтеров с внебольничной пневмонией, вызванной не только SARS-CoV-2, но и другими возбудителями, возникновение Т-лимфоцитопении связано

с уменьшением числа Т-хелперов. У больных COVID-19 зарегистрировано увеличение относительного и абсолютного числа НК-клеток, причем в двух других группах этот показатель не отличался от контрольных значений. У пациентов этой группы увеличивалось относительное и абсолютное число наивных Т-лимфоцитов, в то время как количество активированных/памяти Т-клеток достоверно повышалось только у COVID-19-позитивных волонтеров с бактериальной либо бактериально-грибковой микрофлорой.

Только у больных из этих групп было выявлено увеличение относительного и абсолютного содержания В-лимфоцитов за счет повышения числа В2-клеток (рис. 1, 2).

У COVID-19-негативных пациентов с внебольничными пневмониями, обусловленными наличием бактериальной, либо бактериально-грибковой микрофлорой, в отличие от группы COVID-19-позитивных, не было выявлено Т-лимфоцитопении, однако наблюдалось снижение числа CD4⁺ клеток и увеличение количества цитотоксических лимфоцитов (табл. 3). У этих больных также было зарегистрировано повышение, по сравнению с контрольной группой, относительного и абсолютного содержания активированных/памяти Т-клеток, а также В- и В2-лимфоцитов.

Таблица 2. Абсолютное ($\times 10^9$ /л) содержание основных популяций и субпопуляций Т-лимфоцитов у пациентов с внебольничными пневмониями

Table 2. Absolute ($\times 10^9$ /l) level of major T-lymphocyte populations and subsets in patients with community-acquired pneumonia

Популяции и субпопуляции лимфоцитов периферической крови Populations and subpopulations of peripheral blood lymphocytes	Контрольная группа Control group	Группы пациентов Patient groups		
		SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 бактерии SARS-CoV-2 bacteria	SARS-CoV-2 бактерии грибы SARS-CoV-2 bacteria fungi
Т-лимфоциты (CD45⁺CD3⁺) T-lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺)	1,21 \pm 0,03	0,9 \pm 0,03*	0,8 \pm 0,06*	0,7 \pm 0,02*
Т-хелперы (CD45⁺CD3⁺CD4⁺) T-helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺)	1,0 \pm 0,04	0,88 \pm 0,05	0,7 \pm 0,03*,**	0,6 \pm 0,01*,**
Цитотоксические лимфоциты (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) Cytotoxic lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺)	0,45 \pm 0,02	0,31 \pm 0,02*	0,47 \pm 0,03**	0,43 \pm 0,03**
НК-клетки (CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺) NK cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	0,21 \pm 0,04	0,35 \pm 0,02*	0,16 \pm 0,06	0,15 \pm 0,01
ТНК-клетки (CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺) TNK cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	0,09 \pm 0,03	0,07 \pm 0,04	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,03
Наивные Т-лимфоциты (CD45⁺CD45RO⁻CD45RA⁺) Naive T-lymphocytes (CD45 ⁺ CD45RO ⁻ CD45RA ⁺)	0,75 \pm 0,04	0,9 \pm 0,05*	0,75 \pm 0,02	0,76 \pm 0,03
Активированные/памяти Т-лимфоциты (CD45⁺CD45RO⁺CD45RA⁻) Activated/memory T-lymphocytes (CD45 ⁺ CD45RO ⁺ CD45RA ⁻)	0,35 \pm 0,04	0,4 \pm 0,03	0,59 \pm 0,03*	0,57 \pm 0,02*

Примечание. * — достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,05$); ** — достоверное отличие от группы пациентов с SARS-CoV-2 ($p < 0,05$).
Note. * — significant difference compared to control group ($p < 0.05$); ** — significant difference compared to patients with SARS-CoV-2 ($p < 0.05$).

Обсуждение

В развитии внебольничной пневмонии важную роль играет состояние эффекторов врожденного, а также клеточного и гуморального иммунитета [5]. Различные расстройства в иммунной системе, такие как нарушение формирования клеточного и гуморального иммунитета, продукции цитокинов, функциональной

активности фагоцитирующих клеток, механизмов местной защиты, может быть причиной возникновения и неблагоприятного течения внебольничных пневмоний [7]. Клинические особенности внебольничной пневмонии определяются не только особенностями иммунного ответа, но и характером возбудителя.

Известно, что течение пневмонии у пациентов с COVID-19 отличается от внебольничной

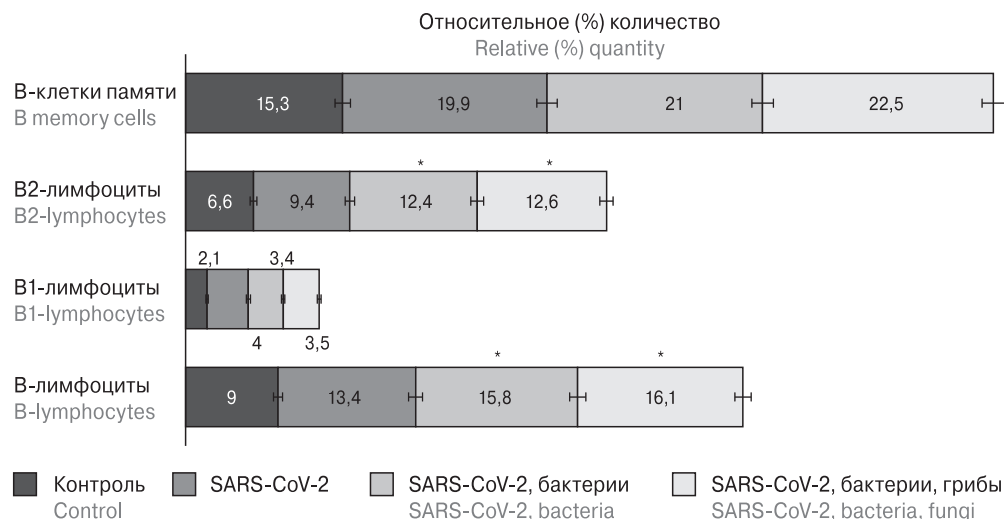


Рисунок 1. Популяции и субпопуляции В-лимфоцитов у пациентов с внебольничными пневмониями в период доминирования геноварианта Омикрон

Figure 1. B-lymphocyte populations and subsets in patients with community-acquired pneumonia during Omicron gene variant dominance

Примечание. * — достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,05$).

Note. * — significant difference compared to control group ($p < 0.05$).

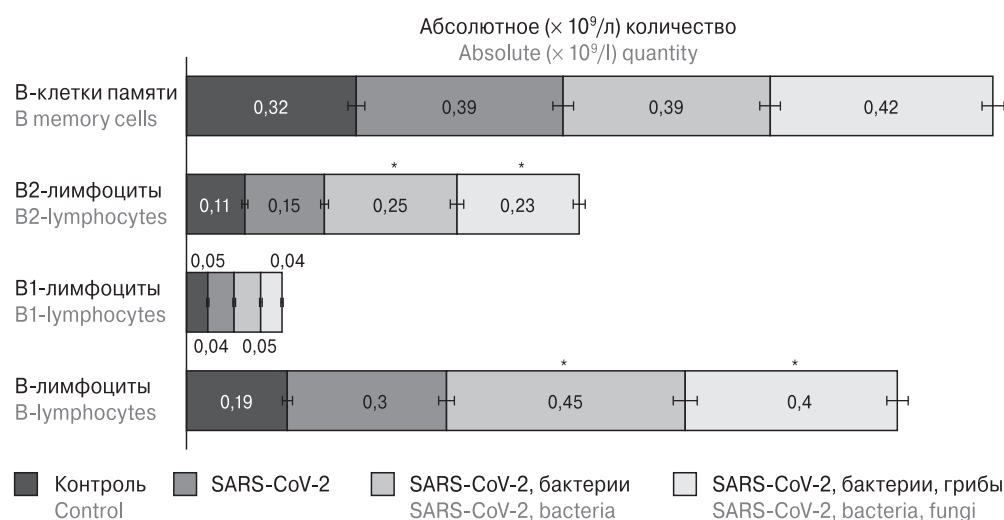


Рисунок 2. Абсолютное содержание В-лимфоцитов у пациентов с внебольничными пневмониями в период доминирования геноварианта Омикрон

Figure 2. Absolute level of B-lymphocytes in patients with community-acquired pneumonia during Omicron gene variant dominance

Примечание. * — достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,05$).

Note. * — significant difference compared to control group ($p < 0.05$).

пневмонии другой этиологии. Было доказано, что снижение количества субпопуляций лимфоцитов, кроме того, что является маркером для прогнозирования тяжести заболевания у пациентов с COVID-19 [11], их уязвимыми к вторичным бактериальным инфекциям [21].

В нашем исследовании при анализе иммунного статуса пациентов с пневмониями, ассоциированными с возбудителем новой коронавирусной инфекции геноварианта Омикрон, выявлено наличие Т-лимфоцитопении, снижение числа CD8⁺ лимфоцитов и увеличение относительного и аб-

Таблица 3. Содержание основных популяций и субпопуляций Т- и В-лимфоцитов у COVID-19-негативных пациентов с внебольничными пневмониями в период циркуляции геноварианта Омикрон

Table 3. The level of major T- and B-lymphocyte populations and subsets in COVID-19-negative patients with community-acquired pneumonia during Omicron gene variant circulation

Популяции и субпопуляции лимфоцитов периферической крови Populations and subpopulations of peripheral blood lymphocytes	Контрольная группа Control group		Группы пациентов Patient groups			
			Бактерии Bacteria		Бактерии, грибы Bacteria, fungi	
	%	$\times 10^9/\text{л}$ $\times 10^9/\text{l}$	%	$\times 10^9/\text{л}$ $\times 10^9/\text{l}$	%	$\times 10^9/\text{л}$ $\times 10^9/\text{l}$
Т-лимфоциты (CD45⁺CD3⁺) T-lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺)	63,7±2,3	1,21±0,03	58,9±2,3	1,23±0,07**	61,0±2,2	1,2±0,06**
Т-хелперы (CD45⁺CD3⁺CD4⁺) T-helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺)	42,6±2,2	1,0±0,04	27,2±1,3*	0,6±0,04*	29,3±3,3*	0,59±0,03*
Цитотоксические лимфоциты (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) Cytotoxic lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺)	22,3±2,2	0,45±0,02	30,4±2,7*	0,9±0,04*,**	32,7±4,4*	0,69±0,04*,**
НК-клетки (CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺) NK cells (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	8,5±2,14	0,21±0,04	10,5±1,5	0,15±0,01	8,4±1,4	0,16±0,01
ТНК-клетки (CD45⁺CD3⁺CD16⁻CD56⁺) TNK cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁻ CD56 ⁺)	5,7±1,5	0,09±0,03	3,8±1,5	0,06±0,03	3,2±1,8	0,07±0,02
Наивные Т-лимфоциты (CD45⁺CD45RO⁻CD45RA⁺) Naive T-lymphocytes (CD45 ⁺ CD45RO ⁻ CD45RA ⁺)	38,2±3,2	0,75±0,04	46,5±2,2	0,78±0,02	46,7±2,2	0,77±0,04
Активированные/памяти Т-лимфоциты (CD45⁺CD45RO⁺CD45RA⁻) Activated/memory T-lymphocytes (CD45 ⁺ CD45RO ⁺ CD45RA ⁻)	22,4±2,2	0,35±0,04	38,7±3,4*	0,69±0,03*,**	35,8±3,9*	0,68±0,05*,**
В-лимфоциты (CD45⁺CD19⁺) B-lymphocytes (CD45 ⁺ CD19 ⁺)	9,0±1,7	0,19±0,09	16,7±2,1*	0,41±0,05*	16,8±2,3*	0,4±0,02*
В1-лимфоциты (CD45⁺CD5⁺CD19⁻CD27⁻) B1-lymphocytes (CD45 ⁺ CD5 ⁺ CD19 ⁻ CD27 ⁻)	2,1±0,3	0,04±0,004	3,7±1,2	0,03±0,01	4,5±1,8	0,05±0,02
В2-лимфоциты (CD45⁺CD19⁺CD5⁻CD27⁻) B2-lymphocytes (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁻)	6,6±1,4	0,11±0,04	12,1±2,4*	0,26±0,01*	12,2±1,8*	0,23±0,05*
В-клетки памяти (CD45⁺CD19⁺CD5⁻CD27⁺) B-Memory cells (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁺)	15,3±1,2	0,32±0,1	33,9±3,2*,**	0,59±0,06*,**	31,4±2,7*,**	0,57±0,06*,**

Примечание. * — достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,05$); ** — достоверное отличие от показателей в аналогичной группе COVID-19-позитивных ($p < 0,05$).

Note. * — significant difference compared to control group ($p < 0.05$); ** — significant difference compared to similar COVID-19 patient group ($p < 0.05$).

солютного количества НК-клеток. Эти данные согласуются с результатами зарубежных исследователей, свидетельствующих о том, что относительное количество цитотоксических лимфоцитов у пациентов с COVID-19 были значительно ниже, чем у COVID-19-негативных пациентов с внебольничными пневмониями, в то время как относительное содержание натуральных киллеров достоверно выше [15]. В отличие от пациентов с легким течением болезни, принимающих участие в наших исследованиях, у пациентов с тяжелой формой COVID-19 описано уменьшение циркулирующих CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, регуляторных Т-клеток и естественных киллеров [16]. Дефицит NK и CD8⁺ клеток может способствовать увеличению тяжести и длительности заболевания [13]. Следует отметить, что у больных, инфицированных геновариантом SARS-CoV-2 1.617.2 (Дельта), тоже регистрировалось наличие Т-лимфоцитопении за счет снижения числа цитотоксических лимфоцитов, однако увеличения количества НК-клеток обнаружено не было [4].

У пациентов с SARS-CoV-2 геноварианта Омикрон, в отличие от инфицированных геновариантом Дельта, относительное и абсолютное количество активированных/памяти Т-клеток не отличалось от контрольных значений. Как и при доминировании геноварианта Дельта, нам не удалось выявить у COVID-19-позитивных пациентов достоверную разницу по сравнению контрольной группой обследованных в содержании популяций и субпопуляций В-лимфоцитов.

У больных COVID-19, обусловленной B.1.1.529 (Омикрон), у которых были верифицированы возбудители бактериальных, а также бактериальных и грибковых инфекций, в отличие от пациентов с SARS-CoV-2, наблюдалось уменьшение относительного и абсолютного числа Т-хелперов, увеличение относительного и абсолютного количества активированных/памяти Т-клеток. У пациентов с бактериальной микрофлорой, в отличие от больных аналогичной группы, но инфицированных штаммом Дельта [4], выявлено увеличение относительного и абсолютного числа В- и В2-лимфоцитов.

У COVID-19-негативных пациентов с внебольничными пневмониями бактериальной и бактериально-грибковой природы, так же как и в период циркулирования SARS-CoV-2 1.617.2

(Дельта) [4], было повышено относительное и абсолютное содержание В- и В2-лимфоцитов, а также общей популяции В-клеток памяти на всех этапах исследования. В отличие от COVID-19-позитивных, у пациентов этих групп регистрировалось, при отсутствии Т-лимфоцитопении, снижение числа CD4⁺ клеток и увеличение количества цитотоксических лимфоцитов, что подтверждает полученные другими авторами данные об играющих важную роль в патогенезе пневмоний нарушениях регуляторных и эффекторных функций Т- и, в меньшей степени, В-лимфоцитов. Для острой пневмонии характерно изменение баланса CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов в сторону снижения хелперов и превалирования цитотоксических клеток, уменьшение пролиферативной активности лимфоцитов, нарушение последовательности переключения синтеза антител [10].

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что в иммунном статусе больных внебольничными пневмониями, у которых верифицированы возбудители различной этиологии, выявлены изменения в относительном и абсолютном содержании Т-хелперов, цитотоксических лимфоцитов, а также в качественном и количественном составе популяции В-лимфоцитов. Эти изменения зависят не только от природы инфекционного агента, но и от доминирующего в данный момент геноварианта SARS-CoV-2. У пациентов с новой коронавирусной инфекцией, вызванной 1.617.2 (Дельта) и B.1.1.529 (Омикрон), выявлены как общие нарушения (наличие Т-лимфоцитопении, обусловленной снижением числа CD8⁺ лимфоцитов), так и характерные для каждого периода отличия: у пациентов, инфицированных Омикроном, увеличивается относительное и абсолютное количество НК-клеток, а содержание активированных/памяти Т-клеток не изменяется, оставаясь на уровне контроля. В отличие от COVID-19-позитивных пациентов, у больных пневмониями бактериальной и бактериально-грибковой природы увеличивается относительное и абсолютное содержание В- и В2-лимфоцитов, а также общей популяции В-клеток памяти. Полученные данные способствуют пониманию механизмов формирования адаптивного иммунного ответа у больных внебольничными пневмониями смешанной этиологии.

Список литературы/References

1. Авдеев С.Н., Белоцерковский Б.З., Дехнич А.В., Зайцев А.А., Козлов Р.С., Проценко Д.Н., Рачина С.А., Синопальников А.И., Яковлев С.В., Ярошецкий А.И. Современные подходы к диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых: обзор литературы // Вестник интенсивной терапии им. А.И. Салтанова. 2021. Т. 3. С. 27–46. [Avdeev S.N., Belotserkovskiy B.Z., Dehnych A.V., Zaytsev A.A., Kozlov R.S., Protsenko D.N., Ratchina S.A., Sinopalnikov A.I., Yakovlev S.V., Yaroshetskiy A.I. Modern approaches to the diagnostics, treatment and prevention of severe community-acquired pneumonia in adults: a review. *Vestnik intensivnoi terapii im. A.I. Saltanova = Annals of Critical Care*, 2021, vol. 3, pp. 27–46. (In Russ.)] doi: 10.21320/1818-474X-2021-3-27-46

2. Бородулина Е.А., Васнева Ж.П., Вдоушкина Е.С., Бородулин Б.Е., Поваляева Л.В. Особенности гематологических и гемостазиологических показателей при коронавирусной инфекции COVID-19 и внебольничной пневмонии // *Acta biomedica scientifica*. 2021. Т. 6, № 1. С. 40–47. [Borodulina E.A., Vasneva Zh.P., Vdoushkina E.S., Borodulin B.E., Povalyaeva L.V. Features of Hematological and Hemostasiological Parameters in Coronavirus Infection COVID-19 and Community-Acquired Pneumonia. *Acta Biomedica Scientifica*, 2021, vol. 6, no. 1, pp. 40–47. (In Russ.)] doi: 10.29413/ABS.2021-6.1.6
3. Вишневецкий В.И., Мироненко И.И., Демьяненко О.В. Влияние тиотриазолина на состояние клеточного и гуморального иммунитета у больных внебольничной пневмонией // *Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация*. 2018. Т. 41, № 4. С. 558–567. [Vishnevsky V.I., Mironenko I.I., Demyanenko O.V. Effect of thiotriazoline on the state of cellular and humoral immunity in patients with community-acquired pneumonia. *Nauchnye vedomosti. Seriya Meditsina. Farmatsiya = Scientific bulletin. Medicine and Pharmacy Series*, 2018, vol. 41, no. 4, pp. 558–567. (In Russ.)] doi: 10.18413/2075-4728-2018-41-4-558-567
4. Иванова И.А., Филиппенко А.В., Павлович Н.В., Аронова Н.В., Цимбалистова М.В., Анисимова А.С., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А., Чемисова О.С., Носков А.К. Количественный и качественный состав основных популяций лимфоцитов у пациентов с внебольничными пневмониями в период пандемии COVID-19 // *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2023. № 3. С. 46–53. [Ivanova I.A., Filippenko A.V., Pavlovich N.V., Aronova N.V., Tsimbalistova M.V., Anisimova A.S., Omelchenko N.D., Trufanova A.A., Chemisova O.S., Noskov A.K. Quantitative and qualitative composition of the main populations of lymphocytes in patients with community-acquired pneumonia during pandemics of COVID-19. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2023, no. 3, pp. 46–53. (In Russ.)] doi: 10.14427/jipai.2023.3.46
5. Изюрова Н.В., Савочкина А.Ю., Узунова А.Н., Нохрин Д.Ю. Цитокиновый профиль при внебольничной пневмонии у детей // *Медицинская иммунология*. 2022. Т. 24, № 5. С. 943–954. [Iziurova N.V., Savochkina A.Yu., Uzunova A.N., Nokhrin D.Yu. Cytokine profile in community-acquired pneumonia in children. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, vol. 24, no. 5, pp. 943–954. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CPI-2538
6. Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Тюрина Е.Б., Хайруллина Р.М., Бикметова Н.Р. Особенности иммунных нарушений при внебольничных пневмониях // *Медицинская иммунология*. 2007. Т. 9, № 6. С. 605–612. [Mavzyutova G.A., Fazlyeva R.M., Tyurina E.B., Khairullina R.M., Bikmetova N.R. Features of immune disorders in community-acquired pneumonia. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, vol. 9, no. 6, pp. 605–612. (In Russ.)]
7. Мирхайдаров А.М., Фархутдинов У.Р., Фархутдинов Р.Р. Иммунный статус больных внебольничной пневмонией и эффективность иммуновенина в комплексной терапии // *Медицинский вестник Башкортостана*. 2016. Т. 11, № 2 (62). С. 12–14. [Mirkhaidarov A.M., Farkhutdinov U.R., Farkhutdinov R.R. The immune status of patients with community-acquired pneumonia and the effectiveness of immunovenin in complex therapy. *Meditsinskii vestnik Bashkortostana = Medical Bulletin of Bashkortostan*, 2016, vol. 11, no. 2 (62), pp. 12–14. (In Russ.)]
8. Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний: МУК 4.2.3115-13. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. 39 с. [Laboratory diagnostics of community-acquired pneumonia: Guidelines 4.2.3115-13. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rosпотребнадzor, 2014. 39 p. (In Russ.)]
9. Невзорова В.А., Боровская Т.Ф., Дмитриева Т.Б., Скребкова Л.Д., Пазыч С.А. Состояние местного и системного иммунного ответа при внебольничной пневмонии у лиц молодого возраста // *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2009. № 3. С. 106–109. [Nevzorova V.A., Borovskaya T.F., Dmitrieva T.B., Skrebkova L.D., Pazyich S.A. Local and system immune response in case of community-acquired pneumonia in young patients. *Tihookeanskiy medicinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2009, no. 3, pp. 106–109. (In Russ.)]
10. Парахонский А.П. Нарушения иммунной системы у больных пневмонией и методы их коррекции // *Современные наукоемкие технологии*. 2005. № 1. С. 116–117. [Parakhonsky A.P. Disorders of the immune system in patients with pneumonia and methods of their correction. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii = Modern High-Tech Technologies*, 2005, no. 1, pp. 116–117. (In Russ.)]
11. De Rose D.U., Pace P.G., Ceccherini-Silberstein F., Dotta A., Andreoni M., Sarmati L., Iannetta M. T lymphocyte subset counts and interferon-gamma production in adults and children with COVID-19: a narrative review. *J. Pers. Med.*, 2023, vol. 13, no. 5: 755. doi: 10.3390/jpm13050755
12. Ganji A., Farahani I., Khansarinejad B. Ghazavi A., Mosayebi G. Increased expression of CD8 marker on T-cells in COVID-19 patients. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2020, vol. 83: e102437. doi: 10.1016/j.bcmd.2020.102437
13. Lagadinou M., Zareifopoulos N., Gkentzi D., Sampsonas F., Kostopoulou E., Marangos M., Solomou E. Alterations in lymphocyte subsets and monocytes in patients diagnosed with SARS-CoV-2 pneumonia: a mini review of the literature. *Eur. Rev. Med. Pharmaco. Sci.*, 2021, vol. 25, no. 15, pp. 5057–5062. doi: 10.26355/eurrev_202108_26463
14. Lippi G., Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2020, vol. 25, no. 58 (7), pp. 1131–1134. doi: 10.1515/cclm-2020-0198
15. Liu G., Jiang X., Zeng X., Pan Y., Xu H. Analysis of lymphocyte subpopulations and cytokines in COVID-19-associated pneumonia and community-acquired pneumonia. *J. Immunol. Res.*, 2021, vol. 2021: 6657894. doi: 10.1155/2021/6657894
16. Liu Y., Tan W., Chen H., Zhu Y., Wan L., Jiang K., Guo Y., Tang K., Xie C., Yi H., Kuang Y., Luo Y. Dynamic changes in lymphocyte subsets and parallel cytokine levels in patients with severe and critical COVID-19. *BMC Infect. Dis.*, 2021, vol. 21, no. 1: 79. doi: 10.1186/s12879-021-05792-7
17. Manickam C., Sugawara S., Reeves R.K. Friends or foes? The knowns and unknowns of natural killer cell biology in COVID-19 and other coronaviruses in July 2020. *PLoS Pathog.*, 2020, vol. 16, no. 8: e1008820. doi: 10.1371/journal.ppat.1008820
18. Mavzyutova G.A., Mukhamadieva L.R., Fazlyeva R.M. Clinical approach to immunocorrection in community-acquired pneumonia. *Medical Council*, 2017, no. 11, pp. 58–63. doi: 10.21518/2079-701X-2017-11-58-63
19. Wang T., Zhao M., Ye P., Wang Q., Zhao Y. Integrated bioinformatics analysis for the screening of associated pathways and therapeutic drugs in coronavirus disease 2019. *Arch. Med. Res.*, 2021, vol. 52, no. 3, pp. 304–310. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.11.009

20. Yang J., Zhong M., Zhang E., Hong K., Yang Q., Zhou D., Xia J., Chen Y.Q., Sun M., Zhao B., Xiang J., Liu Y., Han Y., Xu M., Zhou X., Huang C., Shang Y., Yan H. Broad phenotypic alterations and potential dysfunctions of lymphocytes in COVID-19 recovered individuals. *J. Mol. Cell Biol.*, 2021, vol. 13, no. 3, pp. 197–209. doi: 10.1093/jmcb/mjab014
21. Zhou Y., Guo S., He Y., Zuo Q., Liu D., Xiao M., Fan J., Li X. COVID-19 is distinct from SARS-CoV-2-negative community-acquired pneumonia front cell. *Infect. Microbiol.*, 2020, vol. 10: 322. doi: 10.3389/fcimb.2020.00322

Авторы:

Иванова И.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник, врио зав. лабораторией иммунологии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Филиппенко А.В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Павлович Н.В., д.м.н., главный научный сотрудник, и.о. зав. лабораторией природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Аронова Н.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Цимбалистова М.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Анисимова А.С., младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Омельченко Н.Д., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Труфанова А.А., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Чемисова О.С., к.б.н., доцент кафедры «Биоинженерия» Донского государственного технического университета, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Носков А.К., директор ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия.

Authors:

Ivanova I.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Acting Head of the Immunology Laboratory, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Filippenko A.V., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Immunology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Pavlovich N.V., DSc (Medicine), Head Researcher, Acting Head of the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Aronova N.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Tsimbalistova M.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Anisimova A.S., Junior Researcher, Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Omelchenko N.D., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Immunology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Trufanova A.A., Junior Researcher, Laboratory of Immunology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Chemisova O.S., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Bioengineering, Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Noskov A.K., Director, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation.

ОСОБЕННОСТИ Т-КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ, БОЛЕВШИХ И НЕ БОЛЕВШИХ COVID-19, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ В-ЛИМФОЦИТОВ С ФЕНОТИПОМ CD3⁻CD19⁺CD5⁺ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Э.А. Сафронова^{1,4}, Л.В. Рябова¹, А.В. Зурочка^{2,3}, М.А. Добрынина^{2,3,4}

¹ ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Челябинск, Россия

² ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

³ ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Екатеринбург, Россия

⁴ ФГБУ Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации, Москва, Россия

Резюме. Целью работы явилось изучение Т-клеточного и гуморального звеньев иммунитета у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС), болевших и не болевших COVID-19. Обследовано 86 мужчин с ОКС в возрасте от 40 до 65 лет, перенесших и не болевших COVID-19, которым потребовалось стентирование коронарных артерий. В зависимости от содержания В-лимфоцитов с фенотипом CD3⁻CD19⁺CD5⁺ и наличия, и отсутствия COVID-19 в анамнезе все больные были поделены на 6 групп. Из числа болевших ранее COVID-19: В-лимфоциты CD3⁻CD19⁺CD5⁺ понижены (1 группа), нормальные (2 группа), повышены (3 группа). Не болевшие ранее COVID-19: В-лимфоциты CD3⁻CD19⁺CD5⁺ понижены (4 группа), нормальные (5 группа), повышены (6 группа). Наиболее тяжелая в клинических проявлениях — 1 группа. В этой группе наблюдалось большее число тромбозов стентов и повышенная летальность. Т-лимфоциты в абсолютном плане значимо ниже были в 1 группе по сравнению с другими группами, кроме 4-й. Наименьшее число Т-хелперов как относительно, так и абсолютно, регистрировалось у больных, болевших COVID-19, со сниженными CD3⁻CD19⁺CD5⁺-клетками. NK-лимфоциты как в относительном, так и абсолютном плане, значимо ($p < 0,05$) были выше у пациентов, перенесших COVID-19, в сопоставлении с таковыми показателями у больных без COVID-19 в анамнезе. Т-регуляторные клетки поздней активации в % соотношении были минимальными в группе пациентов с COVID-19 в анамнезе и высокими CD3⁻CD19⁺CD5⁺ лимфоцитами и достоверно ($p < 0,05$) отличались от таковых параметров у лиц без COVID-19 в прошлом. Достоверно

Адрес для переписки:

Сафронова Элеонора Аркадьевна
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64,
ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.
Тел.: 8 (982) 316-34-71. E-mail: safronovaeleonora68@gmail.com

Contacts:

Eleonora A. Safronova
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovskogo str., 64,
South-Ural State Medical University.
Phone: +7 (982) 316-34-71. E-mail: safronovaeleonora68@gmail.com

Для цитирования:

Сафронова Э.А., Рябова Л.В., Зурочка А.В., Добрынина М.А.
Особенности Т-клеточного и гуморального иммунитета пациентов
с острым коронарным синдромом, болевших и не болевших COVID-19,
в зависимости от содержания В-лимфоцитов с фенотипом
CD3⁻CD19⁺CD5⁺ в периферической крови // Инфекция и иммунитет.
2024. Т. 14, № 2. С. 277–288. doi: 10.15789/2220-7619-FOT-16599

Citation:

Safronova E.A., Ryabova L.V., Zurochka A.V., Dobrynina M.A. Features
of T-cell and humoral immunity of patients with acute coronary syndrome,
with and without COVID-19, depending on/peripheral blood B-lymphocytes
with the phenotype CD3⁻CD19⁺CD5⁺ level // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 277–288.
doi: 10.15789/2220-7619-FOT-16599

Работа выполнена по теме Гос. задания «Имунофизиологические и патофизиологические механизмы регуляции и коррекции функций организма»,
№ гос. регистрации 122020900136-4, и поддержана грантом РФФИ и NSFC, 20-515-55003.

This study was carried out under the State assignment "Immunophysiological and pathophysiological mechanisms of regulation and correction of body functions",
state registration No. 122020900136-4, and supported by the by Russian Foundation for Basic Research and NSFC grant, 20-515-55003.

меньше абсолютные значения В-лимфоцитов CD3⁻CD19⁺CD5⁻ были в 1 и 4 группах. Наибольший показатель IgM отмечался в 5 группе — у лиц без COVID-19 в анамнезе и нормальными CD3⁻CD19⁺CD5⁺ клетками и достоверно отличался в сравнении с таковым у больных 1,2,3 групп. В то же время максимальное значение IgG регистрировалось у пациентов с нормальными CD3⁻CD19⁺CD5⁺-клетками, переболевшими COVID-19, и достоверно отличалось от 5 и 6 групп. С1-ингибитор был выше в 3 группе и достоверно отличался от данного параметра в других группах. IgG и IgM к COVID-19 статистически значимо были выше у пациентов, перенесших COVID-19, в сопоставлении с такими показателями у лиц без COVID-19. **Вывод.** У пациентов, перенесших COVID-19 и имеющих низкие В-лимфоциты CD3⁻CD19⁺CD5⁺, в сопоставлении с другими группами достоверно отмечалось снижение иммунной защиты: уменьшение общего количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-лимфоцитов ранней и поздней активации, Т-регуляторных клеток, В-лимфоцитов CD3⁻CD19⁺CD5⁻, что ассоциировалось с более тяжелым течением заболевания — наблюдались тромбозы стентов и большая летальность.

Ключевые слова: В-лимфоциты CD3⁻CD19⁺CD5⁺, COVID-19, острый коронарный синдром, Т-лимфоциты, иммунная система, гуморальный иммунитет.

FEATURES OF T-CELL AND HUMORAL IMMUNITY OF PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME, WITH AND WITHOUT COVID-19, DEPENDING ON/PERIPHERAL BLOOD B-LYMPHOCYTES WITH THE PHENOTYPE CD3⁻CD19⁺CD5⁺ LEVEL

Safronova E.A.^{a,d}, Ryabova L.V.^a, Zurochka A.V.^{b,c}, Dobrynina M.A.^{b,c,d}

^a South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

^c Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome", Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Russian Federation

^d State Research Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to assess the T-cell and humoral immune arms in patients with acute coronary syndrome (ACS) recovered from or not exposed to COVID-19. 86 men with ACS aged 40 to 65 years old, who suffered or not exposed to COVID-19, which required stenting of coronary arteries, were examined. Depending on the peripheral blood B-lymphocyte CD3⁻CD19⁺CD5⁺ level and the former COVID-19 history, all patients were divided into 6 groups. Of the previously COVID-19 exposed subjects CD3⁻CD19⁺CD5⁺ lymphocytes were at: reduced (group 1), normal (group 2), increased (group 3) level. COVID-19 unexposed subjects had CD3⁻CD19⁺CD5⁺ lymphocyte level: reduced (group 4), normal (group 5), increased (group 6). The most severe clinical manifestations were observed in group 1: with a larger rate of stent thrombosis and increased mortality. In absolute numbers, T-lymphocytes were significantly lower in group 1 compared to other groups, except group 4. The lowest both relative and absolute T-helper cell counts were recorded in COVID-19 patients, with reduced CD3⁻CD19⁺CD5⁺ cell level. NK-lymphocytes both in relative and absolute level were significantly ($p < 0.05$) higher in patients who suffered from COVID-19 as compared to those in patients unexposed to previous COVID-19. Percentage of late-activation T-regulatory cells was minimal in patients with former COVID-19 along with high B-lymphocyte CD3⁻CD19⁺CD5⁺ level, which significantly ($p < 0.05$) differed from those in subjects lacking former COVID-19 history. In addition, significantly lower B-lymphocyte CD3⁻CD19⁺CD5⁻ level was found in group 1 and 4. The IgM level peaked in group 5 — subjects lacking former COVID-19 history and having normal CD3⁻CD19⁺CD5⁺ cell level that significantly differed in comparison with that of in group 1, 2, 3. At the same time, the maximum value of IgG level was recorded in COVID-19 patients with normal CD3⁻CD19⁺CD5⁺ cells, and significantly differed from those found in group 5 and 6. C1-inhibitor level was higher in group 3 that significantly differed from that in other groups. SARS-CoV-2-specific IgG and IgM levels were significantly higher in COVID-19-positive vs. COVID-19-negative patients. **Conclusion.** In patients who have suffered COVID-19 with low B-lymphocyte CD3⁻CD19⁺CD5⁺ level, a significantly compromised immune protection was noted in comparison with other groups: a decline in total T-lymphocyte, T-helper, early- and late-activation T-lymphocyte, T-regulatory cell, B-lymphocyte CD3⁻CD19⁺CD5⁻ levels, which was associated with a more severe disease course characterized by stent thrombosis and large mortality.

Key words: B-lymphocytes CD3⁻CD19⁺CD5⁺, COVID-19, acute coronary syndrome, T-lymphocytes, immune system, humoral immunity.

Введение

Коронавирусная болезнь 2019 г., также известная как пандемия COVID-19, оказала пагубное воздействие на повседневную жизнь, повлияв на здоровье и вызвав социально-экономические последствия глобального масштаба. У пациентов с этим новым вирусом часто сообщалось об остром коронарном синдроме (ОКС) — важном сердечно-сосудистом заболевании со значитель-

ной заболеваемостью и смертностью. Появляется все больше свидетельств заболеваемости ОКС при COVID-19, как из-за тромбоза коронарных артерий, так и недостаточного снабжения миокарда кислородом в условиях повышенной потребности [13]. ОКС развивается в основном на фоне атеросклеротически измененных коронарных артерий. Подгруппа В-лимфоцитов с фенотипом CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺ обеспечивают защиту за счет секреции естественных антител

IgM. В обзоре Ait-Oufella H. и соавт. [7] обсуждается недавнее развитие нашего понимания роли субпопуляций Т- и В-клеток при атеросклерозе и рассматривается роль субпопуляций дендритных клеток в контроле адаптивного иммунитета. Сепсис, другие критические состояния и тяжелые системные хронические заболевания способствуют атерогенезу [10]. COVID-19 активирует В-клетки узкой специфичности в течение первых 6 месяцев после заражения [14]. Изменение Т- и В-лимфоцитов у постковидных пациентов продемонстрировано в работе М.А. Добрыниной [1]. В обзоре Akinrinmade A.O. и соавт. [8] показаны потенциальные ассоциации между COVID-19 и ОКС с использованием нескольких баз данных, включая, но не ограничиваясь ими: PubMed, ScienceDirect, данные Всемирной организации здравоохранения и Американской кардиологической ассоциации. Изучена патофизиология ОКС, уделив особое внимание COVID-19, в частности, с использованием различных работ литературы, в которых освещается схема проникновения вируса и репликации через ангиотензинпревращающий фермент II. В обзоре также обсуждалось влияние пандемии на госпитализацию, диагностику и ведение пациентов с ОКС, а также кратко освещалась возможная связь между широко доступными вакцинами против COVID-19 и возможными сердечно-сосудистыми осложнениями. Связь между COVID-19 и ОКС нуждается в более углубленных исследованиях, которые помогут установить, существует ли прямая причинно-следственная и/или провоцирующая корреляция между ними. Понимание этой связи может привести к новым исследованиям и вариантам лечения пациентов с ОКС.

До конца не изучен иммунный ответ пациентов с ОКС, в том числе перенесших COVID-19, что определяет актуальность проводимого исследования.

Целью работы явилось изучение Т-клеточного и гуморального звеньев иммунитета у пациентов с ОКС, болевших и не болевших COVID-19, в зависимости от содержания В-клеток с фенотипом CD3⁻CD19⁺CD5⁺ в периферической крови.

Обследовано 86 мужчин с ОКС в возрасте от 40 до 65 лет, перенесших и не болевших COVID-19, которым в течение первых 3 суток от момента поступления в зависимости от клинической ситуации (экстренно или в отсроченном порядке) потребовалось проведение коронароангиографии (КАГ) на аппарате «Innova JE» и имплантация стентов с лекарственным покрытием Xience Alpine. Перед имплантацией стентов проводилась баллонная ангиопластика коронарных артерий баллонным катетером Sapphire. Перед обследованием все пациенты подписывали информированное согласие (протокол Этического комитета ЮУГМУ Минздрава России № 9 от 11.09.2006 и протокол этического комитета ГАУЗ ОТКЗ ГКБ № 1 г. Челябинска № 12 от 10.10.2022). Помимо

общеклинических исследований всем пациентам проводилось определение иммунологических показателей с помощью метода проточной цитометрии [2]. В зависимости от уровня изучаемой подгруппы В-клеток и наличия или отсутствия COVID-19 в анамнезе все больные были поделены на 6 групп. Из числа болевших ранее COVID-19: 1 группа — с пониженным количеством В-клеток с фенотипом CD3⁻CD19⁺CD5⁺, 2 группа — с нормальными количеством В-клеток с фенотипом CD3⁻CD19⁺CD5⁺, 3 группа — с повышенными В-клетками с фенотипом CD3⁻CD19⁺CD5⁺. Соответственно, не болевшие COVID-19, но вакцинированные: 4 группа — с низкими, 5 группа — с нормальными и 6 группа — с повышенными В-лимфоцитами CD3⁻CD19⁺CD5⁺.

Общий анализ крови (25 параметров: лейкоцитарный, эритроцитарный и тромбоцитарный ростки кроветворения), количественный и качественный состав ростков кроветворения проведен стандартизованным методом на гематологическом анализаторе «Medonic M20» (Швеция).

Методом проточной цитометрии гейтировали по панлейкоцитарному маркеру CD45⁺: CD3⁺ (Т-лимфоциты общие), CD3⁺CD4⁺ (хелперы индукторы), CD3⁺CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (ТНК-клетки) CD3⁻CD16⁺CD56⁺ (натуральные киллеры), CD3⁻CD19⁺CD5⁺ (подгруппа В-лимфоцитов), CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻ (Т-регуляторные клетки/ супрессоры), CD3⁺CD4⁺CD25⁺ (активированные хелперы, ранняя активация лимфоцитов), CD45⁺CD3⁺HLA-DR (активированные Т-лимфоциты — поздняя активация лимфоцитов), В-клетки памяти CD27⁺ с помощью «БекманКультер», «Биолегенда» (США). Оценку иммунного статуса осуществляли методом проточной цитометрии на цитофлюориметре «Navios» (Beckman Coulter, США) по стандартизованной технологии оценки лимфоцитарного звена иммунитета [2, 6].

Оценка фагоцитарной активности частиц латекса диаметром 1,7 мкм нейтрофилами (активность фагоцитоза, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число); спонтанная и индуцированная НСТ-активность нейтрофилов морфологическим методом (световая микроскопия с использованием микроскопов Olimpus (Япония) [3, 4, 5]. Исследование проводится общепринятыми методами оценки функциональной активности фагоцитов.

Уровни общих IgA, IgG, IgM, специфические IgM, IgA, IgG, к коронавирусу COVID-19, С1-ингибитора, С3а и С5а компонентов комплемента (Вектор-Бест, Россия; ООО «Цитокин, Россия) методом иммуноферментного анализа на иммуноферментном анализаторе Multiscan FC ThermoScientific (Китай). Исследование проводилось общепринятыми стандартизованными методами иммуноферментного анализа согласно протоколам производителей тест систем.

В табл. 1 представлена клинико-лабораторная характеристика обследованных пациентов.

Из представленной таблицы видно, что наиболее тяжелая в клинических проявлениях группа — это больные, перенесшие новую коронавирусную инфекцию (COVID-19) и имеющие пониженные В-клетки CD3⁻CD19⁺CD5⁺.

Именно в этой группе наблюдалось большее число тромбозов стентов и выявлена повышенная летальность.

В табл. 2 проиллюстрированы показатели Т-клеточного звена иммунитета у лиц с ОКС.

Из табл. 2 видно, что общее число Т-лимфоцитов было наибольшим у лиц, перенесших COVID-19, имевших повышенные В-клетки CD3⁻CD19⁺CD5⁺. Т-лимфоциты в абсолютном плане значимо ниже были в 1 группе по сравнению с другими группами, кроме 4. Максимальный % Т-лимфоцитов был в 4 группе, а минимальный — в 6. Наименьшее число Т-хелперов как относительно, так и абсолютно, регистрировалось у больных, болевших COVID-19, со сниженными В-клетками CD3⁻CD19⁺CD5⁺. Наибольший процент Т-хелперов был у лиц, не болевших COVID-19, с низкими В-клетками CD3⁻CD19⁺CD5⁺, на втором месте в относительном плане этот показатель наблюдался у пациентов без COVID-19 в анамнезе с нормальными В-клетками CD3⁻CD19⁺CD5⁺. Максимальные абсолютные значения Т-хелперов отмечались в группах, болевших и не болевших COVID-19 с повышенными В-клетками CD3⁻CD19⁺CD5⁺.

Минимальное содержание абсолютного числа Т-цитотоксических лимфоцитов CD3⁺CD8⁺ наблюдалось у больных, не болевших COVID-19 с низкими В-клетками CD3⁻CD19⁺CD5⁺, а максимальное — у переболевших COVID-19 и имеющих высокие В-клетки CD3⁻CD19⁺CD5⁺. Наибольшее число Т-NK-лимфоцитов регистрировалось у лиц с COVID-19 в анамнезе и нормальными В-клетками CD3⁻, CD19⁺, CD5⁺, а наименьшее — без COVID-19 в прошлом и нормальными В-клетками CD3⁻CD19⁺CD5⁺. NK-лимфоциты как в относительном, так и абсолютном плане, значимо ($p < 0,05$) были выше у пациентов, перенесших COVID-19, в сопоставлении с таковыми показателями у больных без COVID-19 в анамнезе.

Минимальное количество Т-лимфоцитов ранней активации регистрировалось у лиц, перенесших COVID-19 и имеющих низкие В-клетки CD3⁻CD19⁺CD5⁺, а наибольшее — в 3 группе. Как относительно, так и абсолютно, Т-лимфоциты поздней активации были наименьшими у больных с COVID-19 в анамнезе и высокими В-клетками CD3⁻CD19⁺CD5⁺. Максимальные значения (абсолютные и относительные) данного показателя отмечались у пациентов с низкими В-лимфоцитами CD3⁻CD19⁺CD5⁺, не болевшими COVID-19.

Максимальный уровень абсолютного числа Т-регуляторных клеток наблюдался у больных с нормальными В-лимфоцитами CD3⁻CD19⁺

CD5⁺, не болевшими COVID-19. Т-регуляторные клетки поздней активации в % соотношении были минимальными в группе пациентов с COVID-19 в анамнезе и высокими В-лимфоцитами CD3⁻CD19⁺CD5⁺ и достоверно ($p < 0,05$) отличались от таковых параметров у лиц без COVID-19 в прошлом.

В табл. 3 представлены данные гуморального звена иммунитета пациентов с ОКС, болевших и не болевших COVID-19.

Исходя из данных табл. 3, можно отметить, что максимальное число В-лимфоцитов CD3⁻CD19⁺CD5⁻ как абсолютно, так и относительно, регистрировалось у лиц с высокими В-клетками CD3⁻CD19⁺CD5⁺ без COVID-19 в анамнезе, на 2 месте — у больных, не болевших COVID-19 и имевших нормальные В-лимфоциты CD3⁻CD19⁺CD5⁺.

Достоверно меньше абсолютные значения В-лимфоцитов CD3⁻CD19⁺CD5⁻ были в 1 и 4 группах. Наибольший показатель IgM отмечался в 5 группе — у лиц без COVID-19 в анамнезе и нормальными В-клетками CD3⁻CD19⁺CD5⁺ и достоверно отличался в сравнении с таковым у больных 1, 2, 3 групп (с COVID-19 в прошлом). В то же время максимальное значение IgG регистрировалось у пациентов с нормальными В-клетками CD3⁻CD19⁺CD5⁺, переболевшими COVID-19, и достоверно отличалось от 5 и 6 групп.

Более высокие цифры C5a фрагмента компонента регистрировались у лиц с COVID-19 в анамнезе, особенно с низкими В-лимфоцитами CD3⁻CD19⁺CD5⁺ (1 группа). На 2 месте — переболевшие COVID-19 и имеющие высокие В-клетки CD3⁻CD19⁺CD5⁺. В этих группах данные показатели достоверно отличались от такового в 6 группе. С1-ингибитор был выше в 3 группе и достоверно отличался от данного параметра в других группах. IgG и М к COVID-19 статистически значимо были выше у пациентов, перенесших COVID-19, в сопоставлении с такими показателями у лиц без COVID-19 в прошлом, но вакцинированных. Максимальный уровень IgG к COVID-19 регистрировался в 1 группе, минимальный — в 5. Наибольшее значение IgM было у пациентов с высокими В-лимфоцитами CD3⁻CD19⁺CD5⁺, болевших COVID-19, а наименьшее у лиц с низкими В-клетками CD3⁻CD19⁺CD5⁺, не болевших COVID-19.

Классические работы указывают на то, что CD5⁺ В-клетки могут быть обнаружены в различных тканях человека и способны продуцировать аутоантитела (включая ревматоидный фактор и антитела против двухцепочечную ДНК). Содержание в периферической крови CD5⁺ В-клеток увеличивается при таких аутоиммунных заболеваниях, как ревматоидный артрит и синдром Шегрена [9, 17]. К сожалению, в настоящее время мало что известно об их функциональных возможностях и точной роли в патофизиологических механизмах аутоиммунных забо-

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов с ОКС, болевших и не болевших COVID-19
 Table 1. Clinical characteristics of patients ACS with and without COVID-19

Показатель Index	Болевшие COVID-19 COVID-19-positive					Не болевшие COVID-19 COVID-19-negative				
	Группа 1 В-клетки CD3-CD19 ⁺ CD5 ⁺ пониженные Group 1 B-cells CD3-CD19 ⁺ CD5 ⁺ downgraded (n = 29)	Группа 2 В-клетки CD3-CD19 ⁺ CD5 ⁺ нормальные Group 2 B-cells CD3-CD19 ⁺ CD5 ⁺ normal (n = 30)	Группа 3 В-клетки CD3-CD19 ⁺ CD5 ⁺ повышены Group 3 B-cells CD3-CD19 ⁺ CD5 ⁺ cells raised (n = 7)	Группа 4 В-клетки CD3-CD19 ⁺ CD5 ⁺ пониженные Group 4 B-cells CD3-CD19 ⁺ CD5 ⁺ downgraded (n = 5)	Группа 5 В-клетки CD3-CD19 ⁺ CD5 ⁺ нормальные Group 5 B-cells CD3-CD19 ⁺ CD5 ⁺ normal (n = 11)	Группа 6 В-клетки CD3-CD19 ⁺ CD5 ⁺ повышены Group 6 B-cells CD3-CD19 ⁺ CD5 ⁺ raised (n = 4)				
Возраст, годы Age, years	56,59±1,18	55,73±1,18	57,28±2,27	60,60±1,73	51,91±2,01	54,25±2,3				
Нестабильная стенокардия, число больных (абс., %) Unstable angina, number of patients (abs., %)	15 (51,72%)	10 (33,33%)	2 (28,57%)	4 (80,00%)	6 (54,55%)	4 (100,00%)				
ОИМ пСТ, число больных (абс., %) AMI with elevation, number of patients (abs., %)	10 (34,48%)	9 (30,00%)	5 (71,43%)	1 (20,00%)	3 (27,27%)	0				
ОИМ бпСТ, число больных (абс., %) AMI without elevation, number of patients (abs., %)	4 (13,79%)	11 (36,7%)	0	0	2 (18,18%)	0				
ОИМ в прошлом, число больных (абс., %) AMI in the past, number of patients (abs., %)	9 (31,03%)	7 (23,3%)	6 (31,6%)	2 (40,00%)	1 (9,09%)	2 (50,0%)				
Риск по Грейсу, баллы Grace risk, points	104,17±5,35 p _{1,2} = 0,007	132,71±9,3 p _{2,5} = 0,037 p _{2,6} = 0,049	118,00±2,0 p _{3,6} = 0,049	125,75±14,04	101,87±10,67	95,25±6,90				
Количество установленных стентов вместе с ранее установленными The number of installed including pre-installed stents										
1 стент, число больных (абс., %) 1 stent, number of patients (abs., %)	10 (34,5%)	10 (33,3%)	6 (85,7%)	3 (60,0%)	5 (45,45%)	3 (75,0%)				
2 стента, число больных (абс., %) 2 stents, number of patients (abs., %)	8 (27,59%)	11 (36,7%)	1 (14,3%)	2 (40,0%)	6 (54,6%)	1 (25,0%)				
3 стента, число больных (абс., %) 3 stents, number of patients (abs., %)	8 (25,4%)	6 (20,0%)	0	0	0	0				
4 стента, число больных (абс., %) 4 stents, number of patients (abs., %)	1 (3,5%)	3 (10,0%)	0	0	0	0				
5 стентов, число больных (абс., %) 5 stents, number of patients (abs., %)	1 (3,5%)	0	0	0	0	0				

Окончание таблицы 1. Клиническая характеристика пациентов с ОКС, болевших и не болевших COVID-19

Table 1. Clinical characteristics of patients ACS with and without COVID-19 (continued)

Показатель Index	Болевшие COVID-19 COVID-19-positive				Не болевшие COVID-19 COVID-19-negative			
	Группа 1 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ пониженные Group 1 B-cells CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ downgraded (n = 29)	Группа 2 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ нормальные Group 2 B-cells CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ normal (n = 30)	Группа 3 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ повышены Group 3 B-cells CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ cells raised (n = 7)	Группа 4 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ пониженные Group 4 B-cells CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ downgraded (n = 5)	Группа 5 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ нормальные Group 5 B-cells CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ normal (n = 11)	Группа 6 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ повышены Group 6 B-cells CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ raised (n = 4)		
Количество установленных стентов в настоящую госпитализацию Number of stents installed during current hospitalization								
1 стент, число больных (абс., %) 1 stent, number of patients (abs., %)	14 (48,3%)	15 (50,0%)	6 (85,7%)	3 (60,0%)	5 (45,5%)	3 (75,0%)		
2 стента, число больных (абс., %) 2 stents, number of patients (abs., %)	9 (31,0%)	11 (36,7%)	1 (14,3%)	2 (40,0%)	6 (54,6%)	1 (25,0%)		
3 стента, число больных (абс., %) 3 stents, number of patients (abs., %)	5 (17,2%)	4 (13,3%)	0	0	0	0		
Тромбозы стента, число больных (абс., %) Stent thrombosis, number of patients (abs., %)	2 (6,9%)	1 (3,3%)	0	0	0	0		
Продолжительность госпитализации, сутки Duration of hospitalization, days	10,21±0,57	10,13±0,4 p _{2,6} = 0,04	10,14±1,33	9,60±0,82	9,00±0,73	8,00±0,355		
Применение морфина, число больных (абс., %) Morphine use, number of patients (abs., %)	9 (31,03%)	14 (46,7%)	2 (28,6%)	1 (20,0%)	3 (27,3%)	0		
Умершие число больных (абс., %) Absolute number of non-survivor patients, %	3 (10,34%)	2 (6,67%)	0	0	0	0		
Общий холестерин, ммоль/л Total cholesterol, mmol/l	4,56±0,19 p _{1,4} = 0,035	4,86±0,22 p _{2,3} = 0,036 p _{2,4} = 0,017	3,933±0,32	3,70±0,13	4,43±0,323	4,55±0,81		
Липопротеиды низкой плотности (ЛПНП), ммоль/л Low density lipoproteins, mmol/l	0,96±0,072	0,93±0,04	0,93±0,08	0,956±0,160	1,09±0,14	0,89±0,10		
Триглицериды, ммоль/л Triglycerides, mmol/l	1,76±0,18	2,20±0,32	1,51±0,15	1,30±0,16	1,63±0,23	1,8±0,40		
Коэффициент атерогенности, единицы Atherogenic coefficient, units	4,51±0,46 p _{1,4} = 0,049	4,2±0,58	3,85±0,62	2,76±0,49	4,17±0,68	4,01±0,99		
Тропонин I, нг/мл Troponin I, ng/ml	9,69±2,04 p _{1,5} = 0,049 p _{1,6} = 0,047	8,06±1,97 p _{2,6} = 0,049	13,25±4,8 p _{3,5} = 0,03 p _{3,6} = 0,04	6,34±5,29	4,01±1,90	0,12±0,01		

Таблица 2. Показатели Т-клеточного звена иммунитета у пациентов с острым коронарным синдромом в зависимости от наличия или отсутствия COVID-19 в анамнезе и уровня В-клетки CD3⁻CD19⁺CD5⁺

Table 2. T-cell immunity in patients with acute coronary syndrome, depending on former COVID-19 and CD3⁻CD19⁺CD5⁺ B-lymphocyte level

Показатель Index	Болевшие COVID-19 COVID-19-positive			Не болевшие COVID-19 COVID-19-negative		
	Группа 1 В-клетки CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ пониженные Group 1 Decreased CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 29)	Группа 2 В-клетки CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ нормальные Group 2 Normal CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 30)	Группа 3 В-клетки CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ повышены Group 3 Increased CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 7)	Группа 4 В-клетки CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ пониженные Group 4 Decreased CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 5)	Группа 5 В-клетки CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ нормальные Group 5 Normal CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 11)	Группа 6 В-клетки CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ повышены Group 6 Increased CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 4)
Т-лимфоциты (CD3⁺CD19⁻), % T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁻), %	74,72±1,64 p _{1,2} = 0,006 p _{1,6} = 0,046	68,57±1,68 p _{2,4} = 0,018 p _{2,5} = 0,049	71,14±3,02	78,30±4,29 p _{4,6} = 0,033	73,09±1,82 p _{5,6} = 0,043	66,85±2,34
Т-лимфоциты (CD3⁺CD19⁻), 10⁶ кл/л T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁻), 10 ⁶ cells/l	1329,2±102,3 p _{1,2} = 0,049 p _{1,3} = 0,001 p _{1,5} = 0,049 p _{1,6} = 0,007	1637,6±155,87	2126,4±178,9 p _{3,4} = 0,019 p _{3,5} = 0,038	1174,0±325,1 p _{4,6} = 0,029	1644,8±168,6	2057,5±148,03
Т-хелперы (CD3⁺ CD4⁺), % T-helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	41,36±1,81	45,45±1,98	44,53±4,67	52,66±3,59	49,78±1,97	43,55±5,89
Т-хелперы (CD3⁺ CD4⁺), 10⁶ кл/л T-helpers (CD3 ⁺ CD4 ⁺), 10 ⁶ cells/l	857,3±70,99 p _{1,3} = 0,003 p _{1,5} = 0,031 p _{1,6} = 0,012	1016,7±92,67	1352,3±190,3 p _{3,4} = 0,049	812,2±236,67	1118,3±116,5	1342,3±198,6
Т-цитотоксические (CD3⁺CD8⁺), % T-cytotoxic (CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	25,28±1,52 p _{1,2} = 0,046	21,9±1,24	23,9±3,56	25,8±4,98	21,5±1,60	20,5±4,75
Т-цитотоксические (CD3⁺CD8⁺), 10⁶ кл/л T-cytotoxic (CD3 ⁺ CD8 ⁺), 10 ⁶ cells/l	471,7±51,07 p _{1,3} = 0,032	532,7±58,22 p _{2,5} = 0,049	694,4±108,4 p _{3,5} = 0,037	357,4±86,38 p _{4,6} = 0,049	480,6±58,03	627,5±139,6
Т-НК лимфоциты (CD3⁺16⁺56⁺), % T-NK lymphocytes (CD3 ⁺ 16 ⁺ 56 ⁺), %	7,67±1,01 p _{1,5} = 0,031	6,99±0,95 p _{2,5} = 0,049	5,73±1,65	7,42±2,06	4,29±0,99	5,45±1,44
Т-НК лимфоциты (CD3⁺16⁺56⁺), 10⁶ кл/л T-NK lymphocytes (CD3 ⁺ 16 ⁺ 56 ⁺), 10 ⁶ cells/l	129,2±23,67	191,4±41,36	181,3±62,5	117,80±48,84	104,09±34,33	170,3±48,6
НК-лимфоциты (CD3⁻16⁺56⁺), % NK-lymphocytes (CD3 ⁻ 16 ⁺ 56 ⁺), %	12,42±1,60 p _{1,5} = 0,018	13,03±1,47 p _{2,5} = 0,007	12,33±2,47 p _{3,5} = 0,013	7,62±2,13	6,63±1,03	8,98±2,85
НК-лимфоциты (CD3⁻16⁺56⁺), 10⁶ кл/л NK-lymphocytes (CD3 ⁻ 16 ⁺ 56 ⁺), 10 ⁶ cells/l	234,3±42,76	320,7±57,57 p _{2,5} = 0,042	371,7±91,5 p _{3,4} = 0,027 p _{3,5} = 0,006	119,8±47,16 p _{4,6} = 0,042	148,09±28,64	274,3±83,9

Окончание таблицы 2. Показатели Т-клеточного звена иммунитета у пациентов с острым коронарным синдромом в зависимости от наличия или отсутствия COVID-19 в анамнезе и уровня В-клетки CD3⁺CD19⁺CD5⁺

Table 2. T-cell immunity in patients with acute coronary syndrome, depending on former COVID-19 and CD3⁺CD19⁺CD5⁺ B-lymphocyte level (continued)

Показатель Index	Болезни COVID-19 COVID-19-positive				Не болевшие COVID-19 COVID-19-negative			
	Группа 1 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ пониженные Group 1 Decreased CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 29)	Группа 2 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ нормальные Group 2 Normal CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 30)	Группа 3 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ повышены Group 3 Increased CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 7)	Группа 4 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ пониженные Group 4 Decreased CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 5)	Группа 5 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ нормальные Group 5 Normal CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 11)	Группа 6 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ повышены Group 6 Increased CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 4)		
В-клетки CD3⁺CD19⁺CD5⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells								
Т-лимфоциты (CD3⁺CD4⁺CD25⁺, ранняя активация), % T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , early activation), %	8,91±0,65 P _{1,2} = 0,044	7,63±0,37	7,01±1,22	8,74±0,81	7,51±0,68	7,15±0,83		
Т-лимфоциты (CD3⁺CD4⁺CD25⁺, ранняя активация), 10⁶ кл/л T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , early activation), 10 ⁶ cells/l	69,17±6,20 P _{1,3} = 0,043	77,43±8,68	102,1±29,1	71,40±19,42	81,9±10,7	93,5±12,42		
Т-лимфоциты (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺, поздняя активация), % T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ , late activation), %	6,41±0,51 P _{1,3} = 0,004 P _{1,4} = 0,019 P _{1,5} = 0,048		3,33±0,51 P _{3,4} = 0,001 P _{3,5} = 0,049	9,46±1,75 P _{4,5} = 0,004	4,84±0,64	5,85±3,09		
Т-лимфоциты (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺, поздняя активация), 10⁶ кл/л T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ , late activation), 10 ⁶ cells/l	51,55±5,93 P _{1,4} = 0,049	60,40±6,36	45,71±9,53	82,40±39,51	55,00±9,42	68,75±31,80		
Т-регуляторные клетки (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻), % T-regulatory cells (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻), %	3,22±0,35 P _{1,3} = 0,049	3,20±0,34	2,20±0,36 P _{3,4} = 0,038	4,38±1,23	3,56±0,66	2,12±0,53		
Т-регуляторные клетки (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁺), 10⁶ кл/л T-regulatory cells (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁺), 10 ⁶ cells/l	26,59±2,77 P _{1,5} = 0,043	30,80±4,42	29,71±5,176	26,20±5,24	37,54±7,07	27,25±5,76		
Т-регуляторные клетки, поздняя активация (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻HLA-DR⁺), % T-regulatory cells, late activation (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ HLA-DR ⁺), %	1,25±0,17 P _{1,3} = 0,041	1,01±0,12 P _{2,4} = 0,009	0,60±0,18 P _{3,4} = 0,017 P _{3,5} = 0,049	1,94±0,61	1,21±0,26	0,87±0,46		
Т-регуляторные клетки, поздняя активация (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁺HLA-DR⁺), abs. 10⁶ кл/л T-regulatory cells, late activation (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁺ HLA-DR ⁺), abs. 10 ⁶ cells/l	9,59±1,18	9,33±1,00	8,43±2,59	11,20±1,65	12,64±2,74	10,25±4,87		

Таблица 3. Показатели гуморального иммунитета у больных с острым коронарным синдромом, болевших и не болевших COVID-19, в зависимости от содержания В1-клеток в периферической крови

Table 3. Humoral immunity in patients with acute coronary syndrome, with and without COVID-19, depending on peripheral blood CD3⁺CD19⁺CD5⁺ B cell level

Показатель Index	Болевшие COVID-19 COVID-19-positive			Не болевшие COVID-19 COVID-19-negative		
	Группа 1 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ понижены Group 1 Decreased CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 29)	Группа 2 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ нормальные Group 2 Normal CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 30)	Группа 3 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ повышены Group 3 Increased CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 7)	Группа 4 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ понижены Group 4 Decreased CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 5)	Группа 5 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ нормальные Group 5 Normal CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 11)	Группа 6 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ повышены Group 6 Increased CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 4)
В-клеток CD3⁺CD19⁺CD5⁺ B-cells CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺	8,45±0,94 P _{1,2} < 0,001 P _{1,3} = 0,001 P _{1,5} < 0,001 P _{1,6} < 0,001	14,51±0,84 P _{2,4} = 0,012 P _{2,6} = 0,002	14,84±0,97 P _{3,4} = 0,033 P _{3,6} = 0,019	8,88±3,22 P _{4,5} = 0,001 P _{4,6} = 0,0006	16,40±1,33 P _{5,6} = 0,002	22,40±3,95
В-лимфоциты (CD3⁺CD19⁺), 10⁶ кл/л B-lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁺), 10 ⁶ cells/l	132,38±13,41 P _{1,2} < 0,001 P _{1,3} < 0,001 P _{1,5} < 0,001 P _{1,6} < 0,001	330,57±33,95 P _{2,3} = 0,049 P _{2,4} = 0,009 P _{2,6} = 0,0007	458,28±65,39 P _{3,4} = 0,001 P _{3,6} = 0,047	119,2±42,47 P _{4,5} = 0,001 P _{4,6} = 0,0006	360,54±40,04 P _{5,6} = 0,002	682,50±111,57
Иммуноглобулин А общий, г/л Immunoglobulin A, total, g/l	1,77±0,22	2,02±0,18	1,39±0,46	2,07±0,71	1,67±0,25	1,22±0,52
Иммуноглобулин М общий, г/л Immunoglobulin M, total, g/l	0,53±0,12 P _{1,5} = 0,012	0,63±0,12 P _{2,5} = 0,018	0,30±0,09 P _{3,5} = 0,049	0,57±0,24	1,43±0,52	0,30±0,07
Иммуноглобулин G общий, г/л Immunoglobulin G, total, g/l	12,69±0,82	14,65±1,22 P _{2,5} = 0,049 P _{2,6} = 0,049	11,37±3,62	10,74±1,15	11,45±0,97	9,24±1,31
С1 ингибитор, нг/мл C1 inhibitor, ng/ml	209,67±22,32 P _{1,3} = 0,008	199,52±17,57 P _{2,3} = 0,001 P _{2,6} = 0,049	345,27±58,29 P _{3,4} = 0,015 P _{3,5} = 0,016	163,5±21,42 P _{4,5} = 0,006	231,27±12,30	307,7±135,4
С3а фрагмент компонента, нг/мл C3a complement fragment, ng/ml	142,03±8,33	144,49±6,89	138,41±13,05	127,59±19,30	158,31±10,12 P _{5,6} = 0,049	128,12±10,12
С5а фрагмент компонента, нг/мл C5a complement fragment, ng/ml	50,70±3,59 P _{1,6} = 0,021	44,57±4,50	48,95±7,36 P _{3,6} = 0,049	40,15±4,63	44,45±9,55	29,33±7,01

Окончание таблицы 3. Показатели гуморального иммунитета у больных с острым коронарным синдромом, болевших и не болевших COVID-19, в зависимости от содержания В1-клеток в периферической крови

Table 3. Humoral immunity in patients with acute coronary syndrome, with and without COVID-19, depending on peripheral blood CD3⁺CD19⁺CD5⁺ B cell level (continued)

Показатель Index	Болевшие COVID-19 COVID-19-positive				Не болевшие COVID-19 COVID-19-negative			
	Группа 1 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ пониженные Group 1 Decreased CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 29)	Группа 2 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ нормальные Group 2 Normal CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 30)	Группа 3 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ повышены Group 3 Increased CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 7)	Группа 4 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ пониженные Group 4 Decreased CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 5)	Группа 5 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ нормальные Group 5 Normal CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 11)	Группа 6 В-клетки CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ повышены Group 6 Increased CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ B-cells (n = 4)		
В-клеток CD3⁺CD19⁺CD5⁺ B-cells CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺	0,87±0,10 p _{1,2} < 0,001 p _{1,3} < 0,001 p _{1,5} < 0,001 p _{1,6} < 0,001	2,81±0,29 p _{2,3} = 0,0000 p _{2,4} = 0,011 p _{2,6} = 0,0001	9,77±0,88 p _{3,4} = 0,0000 p _{3,5} = 0,0000	1,04±0,30 p _{4,5} = 0,008 p _{4,6} = 0,008	2,78±0,40 p _{5,6} = 0,003	7,80±2,39		
В-лимфоциты (CD3⁺CD19⁺CD5⁺), 10⁶ кл/л B-lymphocytes, (CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺), 10 ⁶ cells/l	13,31±1,06 p _{1,2} < 0,001 p _{1,3} < 0,001 p _{1,5} < 0,001 p _{1,6} < 0,001	57,8±7,03 p _{2,3} = 0,0000 p _{2,4} = 0,007 p _{2,6} = 0,0000	293,57±38,85 p _{3,4} = 0,0001 p _{3,5} = 0,0000	12,60±3,01 p _{4,5} = 0,003 p _{4,6} = 0,009	60,64±9,98 p _{5,6} = 0,002	247,0±86,72		
В-лимфоциты (CD3⁺CD19⁺CD5⁻), % B-lymphocytes, (CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁻), %	7,59±0,87 p _{1,2} < 0,001 p _{1,3} < 0,001 p _{1,5} < 0,001 p _{1,6} = 0,012	11,70±0,76 p _{2,3} = 0,0002 p _{2,4} = 0,044	5,09±1,36 p _{3,5} = 0,0001 p _{3,6} = 0,027	7,84±3,05 p _{4,5} = 0,019	13,64±1,08	14,62±5,41		
В-лимфоциты (CD3⁺CD19⁺CD5⁻), 10⁶ кл/л B-lymphocytes, (CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁻), 10 ⁶ cells/l	119,17±13,05 p _{1,2} < 0,001 p _{1,3} < 0,001 p _{1,5} < 0,001 p _{1,6} = < 0,001	272,80±29,58 p _{2,3} = 0,049 p _{2,4} = 0,016 p _{2,6} = 0,049	165,28±57,50 p _{3,5} = 0,021 p _{3,6} = 0,041	10 ⁶ ,40±40,51 p _{4,5} = 0,002 p _{4,6} = 0,029	300,45±32,67	336,25±157,47		
IgM к COVID-19, коэффициент позитивности IgM to COVID-19, positivity coefficient	20,33±1,24 p _{1,4} = 0,026 p _{1,5} < 0,001	19,62±1,24 p _{2,4} = 0,040 p _{2,5} = 0,0004	16,68±3,43 p _{3,4} = 0,016	13,68±3,46	9,71±3,00	15,53±5,43		
IgG к COVID-19, коэффициент позитивности IgG to COVID-19, positivity coefficient	9,24±1,41 p _{1,5} < 0,001 p _{1,6} = 0,049	8,14±1,20 p _{2,4} = 0,015 p _{2,5} = 0,0014 p _{2,6} = 0,049	12,26±3,57 p _{3,4} = 0,016 p _{3,5} = 0,0012 p _{3,6} = 0,045	1,49±0,57	1,71±0,66	2,90±1,29		

Примечание. ОИМ с нST — острый инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST, ОИМ бнST — острый инфаркт миокарда без подъема сегмента ST. p — достоверность различий, первая и вторая цифра после p обозначают, какие группы сравнивались.

Note. AMI with nST — acute myocardial infarction with ST segment elevation. AMI rST — acute myocardial infarction without ST segment elevation. p — significance of differences, the first and second digit after p denote compared groups.

леваний человека. Из моделей на мышах известно, что CD5⁻экспрессирующие В-клетки относятся к субпопуляции CD3⁻CD19⁺CD5⁺, которая обычно расположена в серозных полостях и продуцирует низкоаффинные антитела IgM с аутореактивной специфичностью [11]. У человека экспрессия CD5 может быть обнаружена на клеточной мембране переходных CD24⁺⁺⁺ CD38⁺⁺ T1 В-клеток [18], но согласно последним данным, эти клетки способны продуцировать больше IL-10 по сравнению с другими субпопуляциями «переходных» В-клеток [17], что позволяет рассматривать их в качестве одной из популяций регуляторных В-клеток. Кроме того, в рамках общего пула CD5⁺ В-лимфоцитов периферической крови могут быть обнаружены CD3⁻CD19⁺CD5⁺-клетки с фенотипом CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD38^{low/int}CD43⁺, относительное содержание которых в рамках общего пула В-клеток находится в пределах 2% [15].

В работах Sosa-Hernández V.A. и соавт. [19] показано, что компартмент памяти В-клеток уменьшается в тяжелых и критических случаях, а количество клеток, секретирующих антитела, увеличивается в зависимости от тяжести заболевания COVID-19. В-клетки памяти IgM [16] представляют собой своеобразную подгруппу В-клеток памяти, которая, вероятно, возникает в селезенке и вне зародышевых центров и обеспечивает быструю линию защиты от инфекций слизистой оболочки. Их роль в противодействии COVID-19 все еще неясна, но недавние данные, в основном подкрепленные исследованиями

функции участия селезенки в COVID-19, по-видимому, подтверждают мнение о том, что это подмножество В-клеток памяти может выполнять защитную роль против этого вируса, наряду с другими коронавирусами, особенно в остром периоде инфекции, о чем свидетельствуют худшие клинические результаты, наблюдаемые у невакцинированных пациентов с нарушением реакции памяти IgM В и функции селезенки.

Согласно данным Kumar A. и соавт. [12] корреляция субпопуляций лимфоцитов показала важную значимость в общем количестве лимфоцитов у пациентов с легкой и средней степенью тяжести по сравнению с пациентами с тяжелой формой инфекции, в то время как количество CD4⁺ и CD8⁺ продемонстрировало статистическую значимость в случаях инфицирования легкой и средней степени тяжести.

Выводы

У пациентов, перенесших COVID-19 и имеющих низкие уровни В-лимфоцитов CD3⁻CD19⁺CD5⁺, в сопоставлении с другими группами достоверно отмечалось снижение факторов иммунной защиты: уменьшение общего количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-лимфоцитов ранней и поздней активации, Т-регуляторных клеток, CD3⁻CD19⁺CD5⁻-лимфоцитов, что ассоциировалось с более тяжелым течением заболевания, у данных пациентов наблюдались тромбозы стентов и большая летальность.

Список литературы/References

1. Добрынина М.А., Ибрагимов Р.В., Крицкий И.С., Верховская М.Д., Мосунов А.А., Сарапульцев Г.П., Зурочка А.В., Зурочка В.А., Сарапульцев А.П., Комелькова М.В., Рябова Л.В., Праскурничий Е.А. Постковидный синдром иммунопатологии. Характеристика фенотипических изменений иммунной системы у постковидных пациентов // Медицинская иммунология. 2023. Т. 25, № 4. С.791–796. [Dobrynina M.A., Ibragimov R.V., Kritsky I.S., Verkhovskaya M.D., Mosunov A.A., Sarapultsev G.P., Zurochka A.V., Zurochka V.A., Sarapultsev A.P., Komelkova M.V., Ryabova L.V., Praskurnichiy E.A. Post-COVID immunopathology syndrome: characteristics of phenotypical changes in the immune system in post-COVID patients. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, vol. 25, no. 4, pp. 791–796. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2707
2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshevnev V.A. Flow cytometry in biomedical research. *Yekaterinburg: RIO Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2018. 720 p. (In Russ.)]
3. Маянский А.Н., Пазюк Е.А., Макарова Т. П., Паршакова Р.А., Пикуза О.И. Механизм и диагностические возможности реакции восстановления нитросинего тетразолия нейтрофилами человека // Казанский медицинский журнал. 1981. Т. 62, № 4. С. 64–68. [Mayansky A.N., Pazyuk E.A., Makarova T.P., Parshakova R.A., Pikuza O.I. Mechanism and diagnostic capabilities of the reaction of reduction of nitroblue tetrazolium by human neutrophils. *Kazanskii meditsinskii zhurnal = Kazan Medical Journal*, 1981, vol. 62, no. 4, pp. 64–68. (In Russ.)]
4. Маянский, А.Н., Пикуза О.И. Клинические аспекты фагоцитоза. Казань: Магариф, 1993. 180 с. [Mayansky A.N., Pikuza O.I. Clinical aspects of phagocytosis. *Kazan: Magarif*, 1993. 180 p. (In Russ.)]
5. Фрейдлин И. С. Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека: Учеб. пособие. Л., 1986. 37 с. [Freidlin I.S. Methods for studying phagocytic cells in assessing the immune human status: study guide. *Leningrad*, 1986. 37 p. (In Russ.)]
6. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 974–992. [Khaidukov S.V., Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. Standardized technology “Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytofluorimeter analyzers. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, vol. 8 (17), no.4, pp. 974–992. (In Russ.)]
7. Ait-Oufella H., Sage A.P., Mallat Z., Tedgui A. Adaptive (T and B cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis. *Circ. Res.*, 2014, vol. 114, no 10, pp. 1640–1660. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302761
8. Akinrinmade A.O., Obitulata-Ugwu V.O., Obijiofor N.B., Victor F., Chive M., Marwizi F.M., Odion-Omonhemin L.O., Obasi N.B. COVID-19 and Acute Coronary Syndrome: A Literature Review. *Cureus*, 2022, vol. 14, no. 9: e29747. doi: 10.7759/cureus.29747.

9. Dauphinée M., Tovar Z., Talal N. B cells expressing CD5 are increased in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 1988, vol. 31, no. 5, pp. 642–647. doi: 10.1002/art.1780310509).
10. Gusev E., Sarapultsev A. Atherosclerosis and Inflammation: Insights from the Theory of General Pathological Processes. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, no 9: 7910. doi: 10.3390/ijms24097910
11. Kantor A.B., Herzenberg L.A. Origin of murine B cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.*, 1993, vol. 11, pp. 501–538. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.002441
12. Kumar A., Sepolia S., Shilpa R.H., Rezayani G., Kumari S., Aastha, Gupta S. Role of Hematological and Immunological Parameters in COVID-19 Patients. *J. Pharm. Bioallied Sci.*, 2021, vol. 13, no. 2, pp. 238–243. doi: 10.4103/jpbs.JPBS_655_20
13. Lasica R., Djukanovic L., Mrdovic I., Savic L., Ristic A., Zdravkovic M., Simic D., Krljanac G., Popovic D., Simeunovic D., Rajic D., Asanin M. Acute Coronary Syndrome in the COVID-19 Era-Differences and Dilemmas Compared to the Pre-COVID-19 Era. *J. Clin. Med.*, 2022, vol. 11, no. 11: 3024. doi: 10.3390/jcm11113024.
14. Park Y.J., Pinto D., Walls A.C., Liu Z., De Marco A., Benigni F., Zatta F., Silacci-Fregni C., Bassi J., Sprouse K.R., Addetia A., Bowen J.E., Stewart C., Giurdanella M., Saliba C., Guarino B., Schmid M.A., Franko N.M., Logue J.K., Dang H.V., Hauser K., di Iulio J., Rivera W., Schnell G., Rajesh A., Zhou J., Farhat N., Kaiser H., Montiel-Ruiz M., Noack J., Lempp F.A., Janer J., Abdelnabi R., Maes P., Ferrari P., Ceschi A., Giannini O., de Melo G.D., Kergoat L., Bourhy H., Neyts J., Soriaga L., Purcell L.A., Snell G., Whelan S.P.J., Lanzavecchia A., Virgin H.W., Piccoli L., Chu H.Y., Pizzuto M.S., Corti D., Vesler D. Imprinted antibody responses against SARS-CoV-2 Omicron sublineages. *Science*, 2022, vol. 378, no. 6620, pp. 619–627. doi: 10.1126/science.adc9127
15. Rodriguez-Zhurbenko N., Quach T.D., Hopkins T.J., Rothstein T.L., Hernandez A.M. Human B-1 Cells and B-1 Cell Antibodies Change With Advancing Age. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 19, no. 10: 483. doi: 10.3389/fimmu.2019.00483
16. Rossi C.M., Lenti M.V., Merli S., Di Sabatino A. Role of IgM Memory B Cells and Spleen Function in COVID-19. *Front. Immunol.*, 2022, no. 13: 889876. doi: 10.3389/fimmu.2022.889876
17. Simon Q., Pers J.O., Cornec D., Le Pottier L., Mageed R.A., Hillion S. In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, vol. 137, no. 5, pp. 1577–1584.e10. doi: 10.1016/j.jaci.2015.09.014
18. Sims G.P., Ettinger R., Shirota Y., Yarboro C.H., Illei G.G., Lipsky P.E. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*, 2005, vol. 105, no. 11, pp. 4390–4398. doi: 10.1182/blood-2004-11-4284
19. Sosa-Hernández V.A., Torres-Ruiz J., Cervantes-Díaz R., Romero-Ramírez S., Páez-Franco J.C., Meza-Sánchez D.E., Juárez-Vega G., Pérez-Fragoso A., Ortiz-Navarrete V., Ponce-de-León A., Llorente L., Berrón-Ruiz L., Mejía-Domínguez N.R., Gómez-Martín D., Maravillas-Montero J.L. B Cell Subsets as Severity-Associated Signatures in COVID-19 Patients. *Front. Immunol.*, 2020, no. 11: 611004. doi: 10.3389/fimmu.2020.611004

Авторы:

Сафронова Э.А., к.м.н., доцент, доцент кафедры поликлинической терапии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия; преподаватель кафедры терапии ФГБУ Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА РФ, Москва, Россия;

Рябова Л.В., д.м.н., доцент, профессор кафедры безопасности жизнедеятельности, медицины катастроф, скорой и неотложной медицинской помощи ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия;

Зурочка А.В., д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Екатеринбург, Россия;

Добрынина М.А., к.м.н., доцент, научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; старший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Екатеринбург, Россия; доцент кафедры терапии Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования ФГБУ Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА РФ, Москва, Россия.

Authors:

Safronova E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Polyclinic Therapy and Clinical Pharmacology, South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation; Lecturer at the Department of Therapy, State Research Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Ryabova L.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Professor of the Department of Life Safety, Disaster Medicine, Emergency Medicine, South Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation;

Zurochka A.V., DSc (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Leading Researcher, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology Ural Regional Branch of the RAS, Yekaterinburg, Russian Federation; Leading Researcher, Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation;

Dobrynina M.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Researcher, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Regional Branch of the RAS, Yekaterinburg, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Internal Medicine, Medical and Biological University of Innovation and Continuing Education, State Research Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan, Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.09.2023
Отправлена на доработку 02.11.2023
Принята к печати 16.05.2024

Received 25.09.2023
Revision received 02.11.2023
Accepted 16.05.2024

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ ТЕЧЕНИЯ COVID-19 В ГРУППЕ РИСКА «МЕДИЦИНСКИЕ РАБОТНИКИ»

И.Д. Решетникова^{1,3}, Ю.А. Тюрин^{1,2}, И.Г. Мустафин², Е.В. Агафонова¹, Н.Д. Шайхразиева⁴

¹ ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия

² ФГАОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Казань, Россия

³ ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет Минобрнауки России, г. Казань, Россия

⁴ Казанская государственная медицинская академия — филиал ГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, г. Казань, Россия

Резюме. Актуальность. Изучение особенностей врожденных и адаптивных механизмов иммунного ответа у медицинских работников, которые являются наиболее уязвимой социальной группой с высоким риском инфицирования, является актуальной задачей исследований. Цель исследования: комплексное изучение врожденных и адаптивных механизмов иммунного ответа и анализ связей между клинически значимыми полиморфизмами (SNP) в генах TLR2, TLR4, уровнем экспрессии TLR2 на моноцитах периферической крови, цитокиновым профилем периферической крови (IL-1 β , IL-10, IL-6, IFN γ , маркер активации тромбоцитов) и специфическим гуморальным иммунным ответом на SARS-CoV-2 у медицинских работников временного инфекционного госпиталя в ранние и поздние сроки реконвалесценции после COVID-19. *Материалы и методы.* В работе применены иммунологические, цитофлуориметрические и молекулярно-генетические методы исследования. *Результаты.* В ранний период реконвалесценции после COVID-19 у МР наблюдается увеличение экспрессии TLR2 рецептора на моноцитах, средняя интенсивность флуоресценции была достоверно выше в 1,5 раза, чем в группе контроля. В поздний период реконвалесценции, через 7 месяцев после перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 было отмечено снижение сыровоточного уровня IFN γ . Депрессия синтеза IFN γ была значительной, его концентрация у МР снизилась в этот период в 82 раза, что было достоверно ниже по сравнению с группой контроля (в 59 раз). Выявлен дисбаланс цитокинов, контролирующего противовирусный врожденный и адаптивный иммунный ответ, у МР с установленной комбинацией полиморфизмов rs5743708 и rs4986790 в генах TLR2, TLR4 с частотой встречаемости не более 6,7%. Установлено, что через 7 месяцев после инфицирования новой коронавирусной инфекцией COVID-19, наблюдается заметное уменьшение уровня IFN γ , IL-1 β и IL-10. Исследования свидетельствуют о нарушениях как врожденных, так и адаптивных механизмов иммунного ответа и необходимости оптимизации лечебно-профилактических мероприятий, направленных на повышение неспецифической резистентности, защиты барьеров слизистых респираторного тракта и выявление генетических предикторов дефектов врожденного и адаптивного иммунного ответа у медицинских работников- реконвалесцентоv COVID-19.

Ключевые слова: медицинские работники, цитокины, SARS-CoV-2, TLR-2- и TLR4-рецепторы.

Адрес для переписки:

Тюрин Юрий Александрович
420015, Россия, г. Казань, ул. Б. Красная, 67,
ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет.
Тел.: 8 (843) 236-67-81.
E-mail: kniem@mail.ru

Contacts:

Yuri A. Tyurin
420015, Russian Federation, Kazan, Bolshaya Krasnaya str., 67,
Kazan Federal University.
Phone: +7 (843) 236-67-81.
E-mail: kniem@mail.ru

Для цитирования:

Решетникова И.Д., Тюрин Ю.А., Мустафин И.Г., Агафонова Е.В., Шайхразиева Н.Д. Изучение молекулярно-генетических и иммунологических предикторов течения COVID-19 в группе риска «медицинские работники» // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 289–298. doi: 10.15789/2220-7619-AMG-10359

Citation:

Reshetnikova I.D., Tyurin Yu.A., Mustafin I.G., Agafonova E.V., Shaikhrazieva N.D. Assessing molecular genetic and immunological predictors of COVID-19 course in healthcare worker risk group // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 289–298. doi: 10.15789/2220-7619-AMG-10359

ASSESSING MOLECULAR GENETIC AND IMMUNOLOGICAL PREDICTORS OF COVID-19 COURSE IN HEALTHCARE WORKER RISK GROUP

Reshetnikova I.D.^{a,c}, Tyurin Yu.A.^{a,b}, Mustafin I.G.^b, Agafonova E.V.^a, Shaikhrazieva N.D.^d

^a Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Kazan, Russian Federation

^b Kazan State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation

^c Kazan (Volga Region) Federal University, Ministry of Education of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation

^d Kazan State Medical Academy — Branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation

Abstract. Relevance. Studying features of innate and adaptive mechanisms of immune response in medical workers (MW), the most vulnerable social group with a high risk of infection, is an urgent research task. The aim of the study: Comprehensive study of innate and adaptive immune mechanisms and analyzing relationships between clinically significant polymorphisms (SNPs) in TLR2, TLR4 genes, TLR2 expression level on peripheral blood monocytes, peripheral blood cytokine profile (IL-1 β , IL-10, IL-6, IFN γ , platelet activation marker) and SARS-CoV-2-specific humoral immune response in medical workers (MW) at a temporary infectious disease hospital in early and late COVID-19 convalescence. *Materials and methods.* immunologic, cytofluorimetric and molecular-genetic research methods were applied. Adaptive immune response in medical workers — COVID-19 convalescent subjects. *Results.* Early post-COVID-19 convalescence period in MW was linked to higher TLR2 monocyte expression; the mean fluorescence intensity was significantly elevated by 1.5-fold compared to control group. Late convalescence period (7 months post-COVID-19) was characterized by lowered serum IFN γ level. A decline in IFN γ production was significant: decreased by 82-fold in MR that was markedly stronger compared to control group (59 times). The imbalance of cytokines controlling antiviral innate and adaptive immune response was revealed in MW with identified combination of polymorphisms rs5743708 and rs4986790 in TLR2, TLR4 genes with the rate not exceeding 6.7%. It was found that 7 months after COVID-19 there was a markedly decreased IFN γ , IL-1 β and IL-10 levels. The studies indicate both altered innate and adaptive immune mechanisms and a need to optimize therapeutic and prophylactic measures aimed at increasing patient-intrinsic resistance, protection of respiratory tract mucosal barriers and identification of genetic predictors of defects in innate and adaptive immune response in medical workers — COVID-19 convalescent subjects.

Key words: medical workers, cytokines, SARS-CoV-2, TLR-2 and TLR4-receptors.

Введение

С начала эпидемии новой коронавирусной инфекции COVID-19 в январе–марте 2020 г. в Китае, а в последующем — в Европе и Северной Америке, сообщается о случаях внутрибольничного инфицирования SARS-CoV-2, в том числе и среди медицинских работников (МР) [3]. Комплексное изучение особенностей врожденных и адаптивных механизмов иммунного ответа у МР, которые являются наиболее уязвимой социальной группой с высоким риском инфицирования, является актуальной задачей исследований.

Состояние иммунной системы и наличие генетически обусловленных иммунологических аномалий, которые затрагивают субпопуляции эффекторных Т- и В-клеток, метаболические пути, связанные с окислительным фосфорилированием, генерацией активных форм кислорода, мутации в ключевых рецепторах, контролирующих общие механизмы врожденного и адаптивного иммунного ответа, оказывают непосредственное влияние на особенности патогенеза и клиническое течение коронавирусной инфекции нового типа в различные периоды заболевания (острый и реконвалесценция — стадия «иммунологического восстановления» после COVID-19), а также на прогноз для паци-

ентов, перенесших эту инфекцию. Существует предположение о том, что эти аномалии могут способствовать формированию пост-COVID-19-синдрома, однако прямых доказательств на данный момент не имеется [14, 15].

Следует отметить, что система макрофагов, являющаяся частью иммунной системы человека, способна выявлять вирусы непосредственно через Толл-подобные рецепторы (TLR), а также через образование комплексов с Fc-рецепторами. Распознавание иммунных комплексов с Fc-рецепторами и TLR инициирует активацию макрофагов и высвобождение эффекторных молекул — цитокинов широкого спектра действия, которые способствуют элиминации вируса. Быстрый клиренс иммунных комплексов критически важен для поддержания иммунного гомеостаза и разрешения воспаления. У восприимчивых людей наблюдается значительная функциональная гетерогенность сигнальной оси Fc-рецептора, а также выраженная генетическая гетерогенность генотипов TLR из-за наличия однонуклеотидных замен (SNP) в генах этих рецепторов. Группа TLR широко представлена и экспрессируется на различных клеточных типах, включая дендритные клетки, макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты и эпителиальные клетки. Недавние исследования показали влияние специфической модификации доменов

Fc-рецепторов, которая характеризуется отсутствием основного остатка фукозы (афукозилирование), на развитие тяжелого течения COVID-19 у пациентов и на прогрессирование симптомов у тех, у кого инфекция сначала имела легкое течение [8]. Согласно проведенным исследованиям, у лиц с клинически значимыми полиморфизмами генов, кодирующих TLR, наблюдается прямая связь между течением бактериальных и вирусных инфекций и возникновением сепсиса. В результате иммунного дисрегуляторного ответа возможно развитие длительных пост-COVID симптомов, связанных с формированием аутоиммунного ответа, направленного против собственных тканевых антигенов, который сохраняется после элиминации вируса и сопровождается тканевым повреждением. TLR — является наиболее исследуемым семейством рецепторов распознавания образов (PRR), основной функцией которых является выявление консервативных структур на микроорганизмах. Они играют важную роль в активации врожденной иммунной системы при распознавании вирусных частиц [12, 16]. Активация TLR приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов, таких, как IL-1, IL-6 и TNF α , вместе с IFN γ . Когда лиганд связывается с TLR, происходит олигомеризация, гомодимеризация или гетеродимеризация рецептора посредством PAMP-TLR взаимодействия, что инициирует передачу сигнала внутри клетки. Среди всех TLR млекопитающих, TLR2 проявляет наибольшую способность распознавания PAMP наиболее широкого спектра возбудителей, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии, микобактерии, грибки, а также вирусы. Этот феномен в основном обусловлен способностью TLR2 гетеродимеризоваться либо с TLR1, либо с TLR6 [7]. Отметим, что TLR2 играет решающую роль в распознавании грамположительных бактерий и микобактерий, что имеет особое клиническое значение. В настоящее время, грамположительные бактерии являются наиболее распространенной причиной серьезных инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи и дисфункцией органов, в том числе, при развитии септического шока в отделениях интенсивной терапии. Это особенно актуально в лечении пациентов с COVID-19 во временных инфекционных госпиталях, где предоставляется специализированная медицинская помощь.

Генетические мутации в генах, кодирующих TLR, в форме SNP, представляют собой различные вариации последовательности ДНК, возникающие при изменении одного нуклеотида в геномном коде. Одна из групп SNP, известных как синонимичные полиморфизмы, не приводят к изменению аминокислот в белке рецептора, поскольку генетический код имеет избыточность. В то время как другая группа, несинонимичные

SNP, может изменить аминокислоту, что существенно влияет на структуру или функцию белка рецептора. Особенный интерес представляет полиморфный вариант SNP TLR2 (rs5743708), который состоит из замены G > A в нуклеотиде 2251, что приводит к замене Arg753 на Gln (Arg753Gln). Этот SNP находится в области высококонсервативного участка белка рецептора TLR2 и ассоциируется с возникновением осложнений при сепсисе [13, 20]. Еще одним важным TLR и активационным функциональным каскадом иммунных реакций, имеющим существенное значение для патогенеза COVID-19, является TLR4 [19]. Стоит отметить, что TLR4 экспрессируется главным образом на клетках иммунной системы, таких как макрофаги, дендритные клетки и моноциты, а также на резидентных клетках легочной ткани и миокарда. В легких экспрессия TLR4 отмечается на низком базальном уровне в альвеолярных клетках, включая легочные макрофаги типа I и II, и в клетках бронхиального эпителия. Интересно, что экспрессия TLR4 и сенсибилизация к липополисахаридам резко возрастает при воспалительных процессах, инфильтрации легких макрофагами. Оказалось, что SNP (rs4986790) TLR4, который характеризуется заменой 1063A > G, и приводит к замещению аспарагиновой кислоты глицином в первичной структуре белкового рецептора (Asp299Gly), связан с высокой восприимчивостью к респираторно-синцитиальному вирусу (RSV), который обладает тропизмом к легочной ткани [10]. Последние исследования по моделированию «шиповидного гликопротеина» — гликопротеина белковой оболочки коронавируса SARS-CoV-2 *in silico* позволяют сделать вывод, что данный гликопротеин имеет наиболее сильное белок-белковое взаимодействие с TLR4. Этот факт, вероятно, подтверждает роль TLR4 в инфекционном процессе при новой коронавирусной инфекции COVID-19 у человека [4, 11].

На основании вышеизложенных теоретических предпосылок, цель исследования состояла в комплексном изучении врожденных и адаптивных механизмов иммунного ответа путем анализа связей между клеточными и генетическими аспектами иммунитета, такими как известные клинически значимые полиморфизмы (SNP) в генах TLR2, TLR4, контролирующим иммунный ответ, уровнем экспрессии TLR2, на моноцитах периферической крови, цитокиновым профилем периферической крови (IL-1 β , IL-10, IFN γ , IL-6) и маркера активации тромбоцитов (sCD40L) и специфическим гуморальным иммунным ответом на SARS-CoV-2 у медицинских работников временного инфекционного госпиталя (ВИГ), которые являются группой высокого риска инфицирования, в ранние и поздние сроки реконвалесценции после COVID-19.

Материалы и методы

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора (протокол № 1 от 17.06.2020). Исследование проведено с июня 2020 г. по июль 2021 г. После подписания информированного согласия в исследование были включены 68 невакцинированных серопозитивных к SARS-CoV-2 МР ВИГ, переболевших новой коронавирусной инфекцией по данным регистра больных, имеющих лабораторное подтверждение (U07.1), или с диагнозом, установленным по данным компьютерной томографии (U07.2), и не имеющих документального подтверждения факта перенесенного заболевания, в том числе ОРВИ в осень—весну 2020 г. Информация, собранная в исследовании, включала: паспортные данные, место работы; должность; клиничко-лабораторные данные (наличие симптомов ОРЗ в осень—весну 2020 г., результаты ПЦР на SARS-CoV-2, подтвержденный диагноз «COVID-19» (при наличии), дата появления симптомов ОРЗ, анализы на COVID-19 (ПЦР или ИФА); наличие хронических заболеваний; эпидемиологический анамнез (предполагаемое место заражения COVID-19, контакты с больными COVID-19 в семье или на работе, выезд из страны или в другие регионы РФ за последние 3 мес.).

Среди 68 участников исследования было 18 мужчин (26,5%) и 50 женщин (73,5%) в возрасте от 18 до 72 лет, средний возраст составил $43,5 \pm 1,51$ лет. Врачей было 36 (52,9%), 25 (36,8%) — среднего медицинского персонала и 7 (10,3%) — младшего персонала. У 69,1% (47 человек) отмечались в анамнезе клинические проявления COVID-19, среди них перенесли инфекцию в легкой форме 29 человек (42,7%), в среднетяжелой — 14 (20,6%), тяжелой — 4 (5,9%) и бессимптомно — 21 (30,9%).

В контрольную группу (15 человек) включали лиц не болевших COVID-19 и с отсутствием полиморфных аллелей SNP TLR2 (rs5743708) и TLR4 (rs4986790) в генотипе.

Группа сравнения больные COVID-19 госпитализированные в ВИГ с тяжелым и среднетяжелым течением COVID-19 (31 пациент), которым было проведено комплексное изучение показателей иммунного ответа и маркера активации тромбоцитов (сывороточных концентраций sCD40L, IL-1 β , IL-10, IFN γ , изучение интенсивности экспрессии TLR2 рецепторов на моноцитах периферической крови и детекций SNP TOLL -2 и 4 в геномной ДНК, фенотипирование субпопуляций лимфоцитов периферической крови).

Определение цитокинов в сыворотке крови (IL-1 β , IL-10, IFN γ , IL-6) пациентов и лиц контрольной группы проводили иммунофер-

ментным методом с помощью набора реагентов (Вектор-Бест, Россия) проводили дважды через месяц после появления первых симптомов и через 6 месяцев.

Уровень sCD40L определяли иммуноферментным методом с применением набора реагентов ZyQuik™ sCD40L ELISA Kit (Invitrogen Corporation, США) включающего мышинные моноклональные антитела к sCD40L человека. Коэффициент вариации в контрольных материалах не превышал 5,5%.

Изучение экспрессии TLR2 на мононуклеарах ПК проводили методом проточной цитофлуориметрии. Образец цельной крови 100,0 мкл инкубировали с 5,0 мкл МАТ в течение 10 минут, затем вносили лизирующий эритроциты раствор (Erythrocyte-Lysing Reagent), после чего клетки отмывали раствором Хенкса центрифугированием при 1000 об/мин. Экспрессию рецепторов на клетках (МПК) определяли методом проточной цитофлуориметрии. В каждом образце анализировали не менее 150 000 событий. Для цитофлуориметрического разделения МПК на лимфоциты, моноциты и нейтрофилы, экспрессирующих TLR 2 типа, использовали следующие моноклональные антитела: анти-CD14, меченные APC (e-BioScience), анти-CD 282 (TLR2) меченные Alexa Fluor 488 (e-BioScience).

Определяли процентное содержание моноцитов, экспрессирующих TLR2, а также среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) этих рецепторов на моноцитах. Показатель СИФ — пропорционален экспрессии рецепторов на клеточной мембране.

Мониторинг содержания антител (АТ) IgM и IgG к SARS-CoV-2 осуществлялся ежемесячно с июля 2020 г. методом двухстадийного прямого твердофазного ИФА. Определение IgG к SARS-CoV-2 проводилось с использованием отечественных диагностических тест-систем с сорбированным в лунках планшета рекомбинантным полноразмерным тримеризованным гликопротеином (Spike-белок) вируса SARS-CoV-2 («SARSCoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ», АО «Вектор-Бест», Россия). Для детекции IgM к SARS-CoV-2 использовали отечественные тест-системы с иммобилизованными в лунках антителами к IgM человека и выявлением специфических АТ с помощью конъюгатов, содержащих антигены вируса — N-белок нуклеокапсида («SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ», АО «Вектор-Бест», Россия). Результаты исследования выражались в виде коэффициента позитивности (КП), представляющего собой отношение оптической плотности образца к критической оптической плотности, высчитываемой в каждом анализе. Интерпретация результатов в зависимости от использованной тест-системы

была в следующих пределах: положительными считались образцы с КП, превышающим 1,1–1,2; отрицательными — с КП менее 0,8–0,9. Динамику титров IgM и IgG у каждого МР оценивали по рассчитанной линии тренда среднего геометрического значения титров антител.

Для изучения распространенности SNP TLR2 и TLR4 в исследуемой популяции была сформирована группа из 234 человек, проживающих в г. Казани, которая включала 134 МР ВИГ и консультативной специализированной поликлиники; группу контроля составили 100 лиц, не являющихся медицинскими работниками. Гендерно-возрастная структура участников исследования была однородной (средний возраст составил $45,6 \pm 2,44$ лет, мужчин 21% и женщин 79%).

Скрининг полиморфизмов генов TLR2 и TLR4 у исследуемых индивидуумов проводили методом АС-ПЦР с помощью реагентов «SNP-экспресс» НПФ «Литех» (Москва, Россия). Выделение геномной ДНК человека проводили из образцов буккального эпителия с помощью набора реагентов для экспресс-выделения ДНК из буккального соскоба (НПФ, «Литех», Россия).

Статистическая обработка данных проведена с помощью программ Microsoft Office Excel 2010 и WinPeri (версия 11.65). Были рассчитаны медиана количественных показателей, а также 25-й и 75-персентили признака. Сравнение между группами проводили применяя U-критерий Манна–Уитни, а для характеристика распределения количественных признаков критерий Колмогорова–Смирнова.

Результаты и обсуждение

При изучении цитокинового профиля у группы МР ВИГ, которые были обследованы через месяц после начала симптомов заболевания, отмечается значительное увеличение уровня IFN γ по сравнению с контрольной группой, состоящей из лиц, не инфицированных COVID-19. Кроме того, уровень концентрации IFN γ был значительно выше, чем в группе контроля. Это свидетельствует о сохранении активации макрофагально-моноцитарного звена в ответ на новую коронавирусную инфекцию COVID-19 в период ранней реконвалесценции, как отмечено в табл. 1.

Дополнительно нами было установлено, что концентрация провоспалительного цитокина IL-1 β , который вызывает воспалительную реакцию сосудов и индуцирует синтез белков острой фазы, была статистически значимо выше, чем в контрольной группе. Одновременно мы отметили увеличение уровня IL-10, который способствует дифференци-

ровке В-лимфоцитов, пролиферации цитотоксических Т-лимфоцитов и уменьшению синтеза Th1-цитокинов. Примечательно, что наши исследования показали, что уровень концентрации IL-6 у МР оставался в норме в течение 7 месяцев и не отличался статистически значимо от контрольной группы.

Наше исследование выявило, что в раннем периоде реконвалесценции COVID-19 у МР наблюдается увеличение концентрации sCD40L. Это свидетельствует об активации системы тромбообразования и воспаления. Кроме того, показано, что белок CD40L и его рецептор CD40 экспрессируются различными типами клеток крови и стенки сосудов, включая эндотелиоциты, гладкомышечные клетки, моноциты/макрофаги и Т-лимфоциты. [6]. Исследования подтверждают, что система CD40/CD40L играет значимую роль в активации как тромбоцитов, так и клеток воспаления и эндотелиоцитов. В периферической крови, CD40L присутствует в виде растворимого фрагмента, известного как sCD40L. Активированные тромбоциты являются основным источником (95%) циркулирующего в крови sCD40L. Поэтому sCD40L считается важным маркером активации тромбоцитов и патологических процессов, связанных с увеличением активности системы тромбообразования [5].

При изучении экспрессии TLR2 нами было установлено, что в ранний период реконвалесценции после COVID-19 у МР наблюдается увеличение экспрессии этого рецептора на моноцитах, средняя интенсивность флюоресценции TLR2 была достоверно выше в 1,5 раза, чем в группе контроля.

В динамике, в поздний период реконвалесценции, через 7 месяцев после перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 было отмечено снижение сыровоточного уровня IFN γ — основного интерферона второго типа с противовирусным эффектом, который активирует макрофаги и антиген-презентирующие клетки (АПК) и стимулирует переключение классов антител на IgG 2A. При этом депрессия синтеза IFN γ была значительной, его концентрация у МР снизилась в этот период в 82 раза, что было достоверно ниже по сравнению с группой контроля (в 59 раз). Так же с этим коррелировало и снижение концентрации IL-1 β и IL-10, который стимулирует дифференцировку В-лимфоцитов. Необходимо отметить, что в период поздней реконвалесценции активность тромбоцитарного фактора гемостаза sCD40L так же значительно снижалась и была меньше в 2 раза по сравнению с контрольной группой.

При этом экспрессия TLR2 на моноцитах периферической крови не претерпела существенной динамики снижения в этот период.

Таблица 1. Основные показатели экспрессии TLR2 на моноцитах крови и цитокинового профиля сыворотки крови у медицинских работников временного инфекционного госпиталя в период реконвалесценции COVID-19 через 1 и 7 месяцев после появления симптомов

Table 1. Essential TLR2 expression parameters on blood monocytes and serum cytokine profile in medical workers of a temporary infectious hospital during COVID-19 recuperation at 1 and 7 months after the onset of symptoms

Показатель Indicator	Группа/Group			
	MP через месяц от появления симптомов 29.06.2020 г. MW one month after symptoms onset on June 29, 2020 (n = 68)	MP Через 7 месяцев от появления симптомов 19.01.2021 г. MW 7 months after symptoms onset on January 19, 2021 (n = 68)	Больные COVID-19 острый период COVID-19 acute period patients (n = 31)	Контрольная группа Control group (n = 15)
	1	2	3	4
Экспрессия TLR2 на моноцитах ПК/TLR2 expression on peripheral blood (PB) monocytes				
СИФ TLR2 на моноцитах ПК TLR2 MIF on PB monocytes	2500* [2218–3106]	2300* [1578–2578]	н/о	1350 [1400–1560]
Цитокиновый профиль сыворотки/Serum cytokine profile				
IFNγ (пг/мл) IFN γ (pg/ml)	327,0* [214,3–367,0]	4,0* [1,7–12,0]	0,0* [0,0–1,0]	237,0 [212,0–267,0]
IL-1β (пг/мл) IL-1 β (pg/ml)	3,1 [2,6–3,7]	1,4 [0,0–2,6]	0,0 [0,0–2,0]	2,36 [2,12–2,5]
IL-6 (пг/мл) IL-6 (pg/ml)	1,42 [1,28–3,2]	1,4 [1,28–2,4]	38,5* [14,5–63,5]	1,5 [1,5–1,67]
sCD40L (пг/мл) sCD40L (pg/ml)	23,0* [14,9–34,0]	7,8* [2,0–17,0]	34,0* [15,5–106,0]	16,0 [15,0–16,8]
IL-10 (пг/мл) IL-10 (pg/ml)	5,85 [3,85–9,8]	2,3 [0,6–3,8]	0,12 [0,5–1,3]	4,1 [2,6–3,6]

Таблица 2. Особенности экспрессии TLR2 на моноцитах крови и цитокинового профиля у медицинских работников с выявленными однонуклеотидными полиморфизмами (SNP) в генах TLR2 и TLR4 (через 1 и 7 месяцев после перенесенного COVID-19)

Table 2. Features of TLR2 expression on blood monocytes and cytokine profile in healthcare workers with identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in TLR2 and TLR4 genes (1 and 7 months after COVID-19)

Показатель Indicator	Группа/Group		
	MP (SNP)* через месяц от появления симптомов 29.06.2020 г. MW (SNP)* one month after symptoms appeared on June 29, 2020 (n = 9)	MP (SNP)* через 7 месяцев от появления симптомов 19.01.2021 г. MW (SNP)* After 7 months from symptom onset on January 19, 2021 (n = 9)	Контрольная группа Control group (n = 15)
	1	2	3
Экспрессия TLR2 на моноцитах периферической крови/TLR2 expression on peripheral blood monocytes			
СИФ TLR2 на моноцитах ПК MIF TLR2 on PB monocytes	3050* [2750–3025]	2578* [1875–2550]	1350 [1400–1560]
IFNγ (пг/мл) IFN γ (pg/ml)	216,0* [214,3–350,0]	0,05* [0,02–0,15]	237,0 [212,0–267,0]
IL-1β (пг/мл) IL-1 β (pg/ml)	1,1* [0,6–2,6]	0,02* [0,0–0,1]	2,36 [2,12–2,5]
IL-6 (пг/мл) IL-6 (pg/ml)	1,5 [1,4–3,4]	1,4 [1,3–2,1]	1,5 [1,5–1,67]
sCD40L (пг/мл) sCD40L (pg/ml)	14,0* [11,9–36,0]	8,7 [6,0–15,0]	16,0 [15,0–16,8]
IL-10 (пг/мл) IL-10 (pg/ml)	9,8 [7,85–10,8]	2,3 [0,6–3,8]	4,26 [3,6–4,78]

В сравнительном анализе, нами показано, что у пациентов с COVID-19, проходящих лечение в отделении интенсивной терапии, концентрация IFN γ , IL-1 β и IL-10 почти не определялась, в то время как уровень sCD40L был почти в два раза выше нормы (табл. 1). Нами в этом исследовании выявлено, что только у больных COVID-19 в остром периоде, госпитализированных в ВИГ, уровень IL-6 был статистически значимо выше (в 7 раз), по сравнению с исследуемой группой МР.

В дополнение к этому, нами была выделена небольшая группа МР (9 человек) с детектированными в генотипе одновременно двумя SNP, которые затрагивают гены TLR2 и TLR4 с характерным цитокиновым профилем (табл. 2).

Проведенный анализ цитокинового профиля показал, что у группы МР с генотипами, характеризующимися сочетанием SNP в генах TLR2 и TLR4, наблюдалось практически 5000-кратное снижение уровня IFN γ через 7 месяцев после заболевания, а также 118-кратное снижение уровня IL-1 β . Уровень sCD40L тромбоцитарного фактора гемостаза также снижался, но несколько менее значительно (в 1,8 раза ниже нормы).

Нами установлено, что все 9 человек из группы МР, имеющих генотипы, характеризующиеся сочетанием SNP в генах, кодирующих TLR2 и TLR4 перенесли COVID-19 в среднетяжелой форме.

Распределение генотипов SNP в генах TLR2 и TLR4 в исследуемой группе представлено табл. 3.

В группе МР выявили встречаемость полиморфного аллеля А (rs5743708) в гене TLR2 составляющую 4,0% в кододоминантной модели наследования, а полиморфного аллеля G (rs4986790) в гене TLR4 — 9,7%. В контрольной группе эти значения для полиморфного аллеля А (rs5743708) в гене TLR2 составили 2,0%, а для полиморфного аллеля G (rs4986790) в гене TLR4 — 7,5%. Это свидетельствует о более высокой встречаемости соответствующих SNP TLR в группе МР в сравнении с контрольной группой (ОШ = 2,05 и ОШ = 1,4, $p < 0,05$, соответственно), что подтверждено данными табл. 3.

Таким образом, в исследуемой группе города Казани частота распространения полиморфного аллеля А (rs5743708) в гене TLR2 составила 3,2%, а полиморфного аллеля G (rs4986790) в гене TLR4 — 8,76%. Полученные нами результаты по распространенности полиморфного (мутантного) аллеля А (rs5743708, G > A) в гене TLR2, согласуются с данными о частоте распространения этого полиморфного аллеля среди финской и эстонской популяций. Средняя частота полиморфного аллеля А (rs5743708, G > A) в гене TLR2, была 2,96% в финской популяции (исследование FINRISK) и 4,75% среди эстонцев (исследование

«Estonian», включающее 213 человек) [2]. Частота распространения полиморфного аллеля G (rs4986790) в гене TLR4 у нашей изученной части популяции была наиболее близка к популяции эстонцев, где эта частота составила 6,7% (исследование, включающее 4480 человек), и финской популяции, где частота распространения этого полиморфного аллеля составила 12,2% (исследование, включающее 304 человека) [1].

Учитывая выявленную депрессию иммунного ответа у МР ВИГ со снижением продукции провоспалительных цитокинов IFN γ , IL-1 β и IL-10, становится критически важным исследование гуморального специфического иммунного ответа на SARS-CoV-2 в динамике реконвалесценции, включая период, когда концентрация IFN γ снижается. В этот период формирование полноценного адаптивного гуморального противовирусного иммунитета, включая стимуляцию дифференцировки созревания В-лимфоцитов и пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов, необходимо для эффективной противовирусной защиты. Для достижения этой задачи требуется проведение динамического мониторинга гумораль-

Таблица 3. Распространенность однонуклеотидных полиморфизмов TLR2 (rs5743708) и TLR4 (rs4986790) среди медицинских работников и контрольной группы лиц, проживающих в г. Казани

Table 3. Prevalence of TLR2 (rs5743708) and TLR4 (rs4986790) single-nucleotide polymorphisms among medical workers and control subjects in the city of Kazan

Генотип Genotype	МР MW	Контрольная группа Control group	ОШ (95%ДИ) OR (95% CI)
rs5743708 TLR2 (G > A)			
GG	126 (94,0%)	97,0 (97,0%)	2,05 (0,5–7,9)
GA	5 (3,7%)	2,0 (2,0%)	
AA	3 (2,2%)	1 (1,0%)	
Аллель G Allele G	96,0%	98,0%	
Аллель A Allele A	4,0%	2,0%	
Всего Total	134	100	234
rs4986790 TLR4 (A > G, T)			
AA	111 (82,8%)	87 (87,0%)	1,4 (0,6–2,9)
AG	20 (15,0%)	11 (11,0%)	
GG	3 (2,2%)	2,0 (2,0%)	
Аллель A Allele A	90,3%	92,5%	
Аллель G Allele G	9,7%	7,5%	
Всего Total	134	100	234

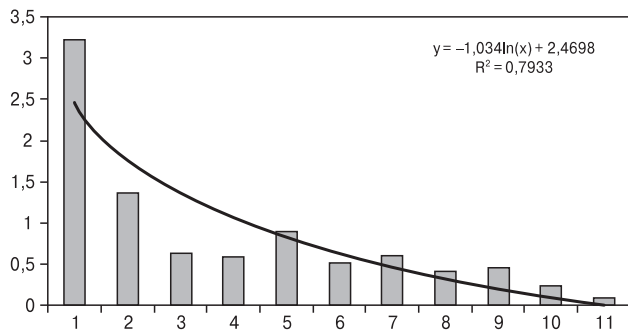


Рисунок 1. Динамика среднегеометрического значения титров IgM к вирусу SARS-CoV-2 у медицинских работников временного инфекционного госпиталя, начиная от дня с впервые полученным положительным результатом

Figure 1. Dynamics of anti-SARS-CoV-2 IgM titer geometric mean value in medical workers of a temporary infectious disease hospital, from first positive result day

ного иммунного ответа в период реконвалесценции, включая выявленный нами критический период [11].

По данным зарубежных исследований, гуморальный иммунный ответ на SARS-CoV-2 включает выработку трех видов антител: IgM, IgA и IgG. Формирование IgA начинается на второй день после начала заболевания, достигает своего пика через 2 недели и сохраняется на протяжении длительного периода времени. Для детекции IgM необходимо примерно 7 суток с момента заражения, а пик достигается через неделю после этого [17, 18]. Этот класс антител (IgG) может сохраняться в организме в течение нескольких месяцев и более, и начи-

нает обнаруживаться в крови приблизительно на третьей неделе или ранее после контакта с вирусом SARS-CoV-2 [9].

С начала сероконверсии (положительного результата) у МР ВИГ по титру IgM и IgG к SARS-CoV-2, отмечается уменьшение значений обоих антител (рис. 1 и 2). Наиболее быстрое снижение титра IgM наблюдалось через месяц после сероконверсии, затем снижение происходило более равномерно со среднемесячным уменьшением в размере $-23,56\%$ (рис. 1). Снижение титра IgG было менее интенсивным, со среднемесячным уменьшением на $1,2\%$ (рис. 2).

Из обнаруженных особенностей иммунного ответа можно выделить следующие факты: спустя семь месяцев после выздоровления от COVID-19 у МР отмечается существенное снижение уровней продукции IFN γ , IL-1 β и IL-10. Однако, экспрессия TLR2 на моноцитах и макрофагах остается значительно высокой, что связано с индивидуальными колебаниями уровня специфических IgM и IgG к SARS-CoV-2.

Заключение

В ходе комплексного исследования врожденных и адаптивных механизмов иммунного ответа у невакцинированных МР ВИГ, были обнаружены следующие особенности: через 7 месяцев после инфицирования новой коронавирусной инфекцией COVID-19, наблюдается заметное уменьшение уровня IFN γ , IL-1 β и IL-10. В то же время, уровень активации экспрессии на моноцитах и макрофагах TLR2 сохраняется в значительной степени высоким, что связано с индивидуальной динамикой сокращения уровня специфических IgM и IgG к SARS-CoV-2.

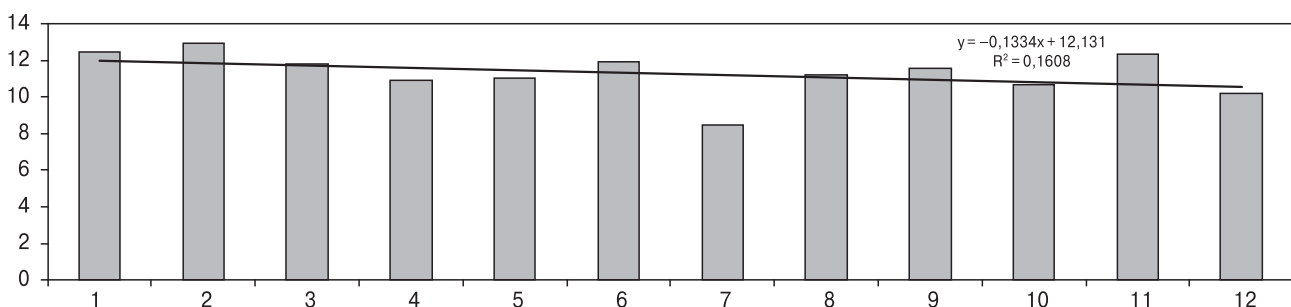


Рисунок 2. Динамика среднегеометрического значения титра IgG к вирусу SARS-CoV-2 у медицинских работников временного инфекционного госпиталя, начиная от дня с впервые полученным положительным результатом

Figure 2. Dynamics of anti-SARS-CoV-2 IgG titer geometric mean value in medical workers of a temporary infectious disease hospital, from first positive result day

Примечание. *Значения статистически значимо различаются по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$; ось ординат — среднегеометрическое значение титров IgG к SARS-CoV-2; по оси абсцисс — порядковый номер точек исследования.

Note. *Values are statistically significantly different compared to the control group, $p < 0.05$; Y-axis — geometric mean value for anti-SARS-CoV-2 IgG titers; X-axis — the serial number of the study points.

В начальный период реконвалесценции после COVID-19 у МР наблюдается повышение экспрессии TLR2 на моноцитах периферической крови. Средняя интенсивность флуоресценции TLR2 достоверно выше в 1,5 раза, чем в группе контроля на протяжении 7 месяцев наблюдения за реконвалесцентами, что указывает на сохранение активности врожденных механизмов иммунной защиты, стимулируемых вирусной и микробной нагрузкой.

В начальные стадии реконвалесценции COVID-19 у МР происходит резкое повышение концентрации sCD40L, что свидетельствует об активации системы тромбообразования и воспаления. Впоследствии, через 7 месяцев, наблюдается значительное снижение уровня данного показателя до значения, которое ниже референсных показателей контрольной группы.

Полученные данные о распространенности полиморфного (мутантного) аллеля A (rs5743708, G > A) в гене TLR2 в изученной когорте МР составляют 4,0%, что соответствует данным о частоте распространенности этого полиморфного аллеля среди финской популяции, где средняя частота полиморфного аллеля A (rs5743708, G > A) составляет до 2,96%.

Распространенность полиморфного аллеля G (rs4986790) в гене TLR4 в изучаемой когорте была сопоставима с эстонской и финской популяциями, где, соответственно, составила 6,7 и 12,2%.

Выявлен дисбаланс цитокинов, контролирующих противовирусный врожденный и адаптивный иммунный ответ, у МР с установленной комбинацией полиморфизмов rs5743708 и rs4986790 в генах TLR2, TLR4 с частотой встречаемости не более 6,7%.

Таким образом, изучение иммунного ответа у невакцинированных МР ВИГ, как группы лиц с высоким риском инфицирования COVID-19, не только в ранние и поздние стадии реконвалесценции, но и в контексте взаимосвязи между известными клинически значимыми полиморфизмами в генах, контролирующими иммунный ответ, и уровнями экспрессии TLR2 на моноцитах периферической крови, цитокиновых профилей периферической крови и маркеров активности тромбоцитов, а также специфического гуморального иммунного ответа на SARS-CoV-2, показало значительные изменения в иммунологических показателях. Эти изменения свидетельствуют о нарушениях как врожденных, так и адаптивных механизмов иммунного ответа и могут снизить устойчивость к респираторным инфекциям. Результаты исследования свидетельствуют о необходимости оптимизации лечебно-профилактических мероприятий, направленных на повышение неспецифической резистентности, защиты барьеров слизистых респираторного тракта и выявление генетических предикторов дефектов врожденного и адаптивного иммунного ответа.

Список литературы/References

1. База данных однонуклеотидных полиморфизмов. NCBI dbSNP rs4986790. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4986790#frequency_tab (06.05.2023)
2. База данных однонуклеотидных полиморфизмов. NCBI dbSNP rs5743708. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs5743708> (06.05.2023)
3. Решетникова И.Д., Агафонова Е.В., Хакимов Н.М., Тюрин Ю.А., Шайхразиева Н.Д., Зиятдинов В.Б. Особенности гуморального иммунного ответа к SARS-CoV-2 у медицинских работников временного инфекционного госпиталя // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2023. Т. 22, № 1. С. 13–21. [Reshetnikova I.D., Agafonova E.V., Tyurin Yu.A., Shaikhrazieva N.D., Ziatdinov V.B. Features of the formation of seroprevalence to SARS-CoV2 in the population of the Republic of Tatarstan during the spread of COVID-19. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccine Prophylaxis*, 2023, vol. 22, no. 1, pp. 13–21. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2023-22-1-13-21
4. Aboudounya M.M., Heads R.J. COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 May Bind and Activate TLR4 to Increase ACE2 Expression, Facilitating Entry and Causing Hyperinflammation. *Mediators Inflamm.*, 2021, no. 2021: 8874339. doi: 10.1155/2021/8874339
5. Henn V., Slupsky J.R., Gräfe M., Anagnostopoulos I., Förster R., Müller-Berghaus G., Kroczeck R.A. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 1998, vol. 391, no. 6667, pp. 591–594. doi: 10.1038/35393
6. Iwata S., Tanaka Y. [The importance of B cell-T cell interaction in autoimmune diseases]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2015, vol. 38, no. 5, pp. 398–402. (In Japan.) doi: 10.2177/jsci.38.398
7. Khanmohammadi S., Rezaei N. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. *J. Med. Virol.*, 2021, vol. 93, no. 5, pp. 2735–2739. doi: 10.1002/jmv.26826
8. Larsen M.D., de Graaf E.L., Sonneveld M.E., Plomp H.R., Nouta J., Hoepel W., Chen H.J., Linty F., Visser R., Brinkhaus M., Šuštić T., de Taeye S.W., Bentlage A.E.H., Toivonen S., Koeleman C.A.M., Sainio S., Kootstra N.A., Brouwer P.J.M., Geyer C.E., Derksen N.I.L., Wolbink G., de Winther M., Sanders R.W., van Gils M.J., de Bruin S., Vlaar A.P.J.; Amsterdam UMC COVID-19; biobank study group; Rispens T., den Dunnen J., Zaaijer H.L., Wuhrer M., Ellen van der Schoot C., Vidarsson G. Afucosylated IgG characterizes enveloped viral responses and correlates with COVID-19 severity. *Science*, 2021, vol. 371, no. 6532: eabc8378. doi: 10.1126/science.abc8378
9. Long Q.X., Liu B.Z., Deng H.J., Wu G.C., Deng K., Chen Y.K., Liao P., Qiu J.F., Lin Y., Cai X.F., Wang D.Q., Hu Y., Ren J.H., Tang N., Xu Y.Y., Yu L.H., Mo Z., Gong F., Zhang X.L., Tian W.G., Hu L., Zhang X.X., Xiang J.L., Du H.X., Liu H.W., Lang C.H., Luo X.H., Wu S.B., Cui X.P., Zhou Z., Zhu M.M., Wang J., Xue C.J., Li X.F., Wang L., Li Z.J., Wang K., Niu C.C.,

- Yang Q.J., Tang X.J., Zhang Y., Liu X.M., Li J.J., Zhang D.C., Zhang F., Liu P., Yuan J., Li Q., Hu J.L., Chen J., Huang A.L. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat. Med.*, 2020, vol. 26, no. 6, pp. 845–848. doi: 10.1038/s41591-020-0897-1
10. López E.L., Ferolla F.M., Toledano A., Yfran E.W., Giordano A.C., Carrizo B., Feldman F., Talarico L.B., Caratozzolo A., Contrini M.M., Acosta P.L.; GUTI Respiratory Infections Network. Genetic Susceptibility to Life-threatening Respiratory Syncytial Virus Infection in Previously Healthy Infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2020, vol. 39, no. 11, pp. 1057–1061. doi: 10.1097/INF.0000000000002827
 11. Lorkiewicz P., Waszkiewicz N. Biomarkers of Post-COVID Depression. *J. Clin. Med.*, 2021, vol. 10, no. 18: 4142. doi: 10.3390/jcm10184142
 12. Menden H.L., Mabry S.M., Venkatraman A., Xia S., DeFranco D.B., Yu W., Sampath V. The SARS-CoV-2 E protein induces Toll-like receptor 2-mediated neonatal lung injury in a model of COVID-19 viremia that is rescued by the glucocorticoid ciclesonide. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2023, vol. 324, no. 5, pp. L722–L736. doi: 10.1152/ajplung.00410.2022
 13. Miri-Moghaddam E., Farhad Mollashahi N., Naghibi N., Garme Y., Bazi A. Arg753Gln and Arg677 Trp Polymorphisms of Toll-Like Receptor 2 In Acute Apical Abscess. *J. Dent. (Shiraz)*, 2018, vol. 19, no. 2, pp. 109–117.
 14. Peghin M., Palese A., Venturini M., De Martino M., Gerussi V., Graziano E., Bontempo G., Marrella F., Tommasini A., Fabris M., Curcio F., Isola M., Tascini C. Post-COVID-19 symptoms 6 months after acute infection among hospitalized and non-hospitalized patients. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2021, vol. 27, no. 10, pp. 1507–1513. doi: 10.1016/j.cmi.2021.05.033
 15. Rojas M., Rodríguez Y., Acosta-Ampudia Y., Monsalve D.M., Zhu C., Li Q.Z., Ramírez-Santana C., Anaya J.M. Autoimmunity is a hallmark of post-COVID syndrome. *J. Transl. Med.*, 2022, vol. 20, no. 1: 129. doi: 10.1186/s12967-022-03328-4
 16. Root-Bernstein R. Innate Receptor Activation Patterns Involving TLR and NLR Synergisms in COVID-19, ALI/ARDS and Sepsis Cytokine Storms: A Review and Model Making Novel Predictions and Therapeutic Suggestions. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, no. 4: 2108. doi: 10.3390/ijms22042108
 17. Zanza C., Romenskaya T., Manetti A.C., Franceschi F., La Russa R., Bertozzi G., Maiese A., Savioli G., Volonnino G., Longhitano Y. Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy. *Medicina (Kaunas)*, 2022, vol. 58, no. 2: 144. doi: 10.3390/medicina58020144
 18. Zhao J., Yuan Q., Wang H., Liu W., Liao X., Su Y., Wang X., Yuan J., Li T., Li J., Qian S., Hong C., Wang F., Liu Y., Wang Z., He Q., Li Z., He B., Zhang T., Fu Y., Ge S., Liu L., Zhang J., Xia N., Zhang Z. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 71, no. 16, pp. 2027–2034. doi: 10.1093/cid/ciaa344
 19. Zhao Y., Kuang M., Li J., Zhu L., Jia Z., Guo X., Hu Y., Kong J., Yin H., Wang X., You F. SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR41. *Cell Res.*, 2021, vol. 31, no. 7, pp. 818–820. doi: 10.1038/s41422-021-00495-9
 20. Żukowski M., Taryma-Leśniak O., Kaczmarczyk M., Kotfis K., Szydłowski Ł., Ciechanowicz A., Brykczyński M., Żukowska A. Relationship between toll-like receptor 2 R753Q and T16934A polymorphisms and *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Anaesthesiol Intensive Ther.*, 2017, vol. 49, no. 2, pp. 110–115. doi: 10.5603/AIT.a2017.0027

Авторы:

Решетникова И.Д., к.м.н., доцент, зам. директора по научной работе ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; доцент кафедры внутренних болезней Института фундаментальной медицины и биологии (ИФМиБ) Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия;

Тюрин Ю.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией иммунологии и разработки аллергенов ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; доцент кафедры биохимии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

Мустафин И.Г., д.м.н., профессор, зав. кафедрой биохимии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

Агафонова Е.В., к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики консультативно-диагностической поликлиники инфекционно-аллергических заболеваний ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; ассистент кафедры пропедевтики детских болезней ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

Шайхразиева Н.Д., к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и дезинфектологии Казанской государственной медицинской академии — филиала ГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, г. Казань, Россия.

Authors:

Reshetnikova I.D., PhD (Medicine), Associate Professor, Deputy Head of Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор, Kazan, Russian Federation; Associate Professor of the Department of Internal Medicine, Department of Fundamental Clinical Medicine, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russian Federation;

Tyurin Yu.A., DSc (Medicine), Leading Researcher, Head of Immunology Laboratory, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор, Kazan, Russian Federation; Associate Professor, Department of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Mustafin I.G., DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Agafonova E.V., PhD (Medicine), Laboratory Diagnostics Doctor, Diagnostics Centre of Infection-Allergic Diseases, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор, Kazan, Russian Federation; Assistant Professor, Department of Propedeutics of Child Diseases, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Shaykhrasieva N.D., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology and Desinfectology, Kazan State Medical Academy — Branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation.

THE ASSOCIATION BETWEEN THE HISTORY OF SUPPLEMENT USE (VITAMIN OR MINERAL) AND COVID-19 DISEASE IN THE PERSIAN COHORT POPULATION

F. Ghorat, A. Ganj Bakhsh, R. Ataee Disfani, R. Borghabani, Z. Jalambadani

Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

Abstract. The aim of the study was to examine the association between vitamin and mineral supplement consumption and the possibility of contracting COVID-19 disease in the Persian cohort population in 2020. This retrospective cohort study was conducted on 4241 people who were registered in the Cohort Registration System. A logistic regression was performed to ascertain the multivariate association between demographic, health variables, and supplement use and the likelihood that participants were infected with COVID-19. The software used was IBM SPSS 24.0, and a significance level of 0.05 was considered. Analyze the quantitative variables, if the variable was normal, the independent t-test was used, and if the variable was not normal, the Mann–Whitney test was used. To compare the distribution of qualitative variables in the groups, a chi-square test or, if necessary, a Fisher's exact test was used. The number of participants in this cohort study was 4241. The average age of the participants in the study was 49.22 ± 8.77 . The OR value of age variable 0.989 (95% CI: 0.927–1.056); sex variable (95% CI: 0.238–2.743, OR = 0.808); BMI variable (95% CI: 0.927–1.056, OR = 0.953); vitamin D variable (95% CI: 0.333–6.769, OR = 1.502); omega3 variable (95% CI: 0.410–7.688, OR = 1.776); calcium variable (95% CI: 0.041–3.738, OR = 0.391); calcium variable (95% CI: 0.041–3.738, OR = 391); multiVIT variable (95% CI: 0.211–5.645, OR = 1.090); VitC variable (95% CI: 0.000–0.000, OR = 0.000); vitE variable (95% CI: 0.000–0.000, OR = 0.000); were the interval includes. There were no statistically significant multivariate associations ($P > 0.05$) between the explanatory variables infected with COVID-19. There was only a statistically significant correlation between the use of iron tablets and contracting COVID-19 ($P = 0.025$). Controlling the variables or identifying causal correlations is not feasible due to the observational nature of the study. The results cannot be safely extrapolated to other regions of the world because the cohort sample was limited to inhabitants of Iran.

Key words: *vitamin, mineral, COVID-19, cohort population, Iran, logistic regression.*

АССОЦИАЦИЯ МЕЖДУ УПОТРЕБЛЕНИЕМ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК (ВИТАМИНОВ ИЛИ МИНЕРАЛОВ) И COVID-19 В ПЕРСИДСКОЙ КОГОРТЕ НАСЕЛЕНИЯ

Горат Ф., Гандж Бахш А., Атаи Дисфани Р., Боргабани Р., Джаламбадани З.

Сабзеварский университет медицинских наук, г. Сабзевар, Иран

Резюме. Цель исследования заключалась в изучении связи между употреблением витаминов и минеральных добавок и возможностью заражения COVID-19 среди населения Ирана в 2020 г. В настоящем ретроспективном когортном исследовании приняли участие 4241 человек, зарегистрированных в Системе регистрации когорт. Была проведена логистическая регрессия для установления многомерной связи между демографи-

Адрес для переписки:

Зейнаб Джаламбадани
Тел.: 05144018301.
E-mail: jalambadaniz@gmail.com; jalambadaniz@medsab.ac.ir

Contacts:

Zeinab Jalambadani
Phone: 05144018301.
E-mail: jalambadaniz@gmail.com; jalambadaniz@medsab.ac.ir

Для цитирования:

Горат Ф., Гандж Бахш А., Атаи Дисфани Р., Боргабани Р., Джаламбадани З. Ассоциация между употреблением пищевых добавок (витаминов или минералов) и COVID-19 в персидской когорте населения // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 299–305. doi: 10.15789/2220-7619-TAB-17593

Citation:

Ghorat F., Ganj Bakhsh A., Ataee Disfani R., Borghabani R., Jalambadani Z. The association between the history of supplement use (vitamin or mineral) and COVID-19 disease in the persian cohort population // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 299–305. doi: 10.15789/2220-7619-TAB-17593

© Ghorat F. et al., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TAB-17593>

ческими переменными, показателями здоровья, использованием пищевых добавок и вероятностью заражения участников COVID-19. В качестве программного обеспечения использовалось IBM SPSS 24.0, уровень значимости установлен 0,05. Проанализированы количественные переменные: при нормальном распределении — использовался независимый t-критерий, при отклонении от нормального распределения — критерий Манна–Уитни. Для сравнения распределения качественных переменных в группах использовался критерий хи-квадрат или, при необходимости, точный критерий Фишера. Число участников проведенного когортного исследования составило 4241, средний возраст участников — $49,22 \pm 8,77$. Значение ОШ возрастной переменной 0,989 (95% ДИ: 0,927–1,056); половая переменная (95% ДИ: 0,238–2,743, ОШ = 0,808); переменная ИМТ (95% ДИ: 0,927–1,056, ОШ = 0,953); переменная витамина D (95% ДИ: 0,333–6,769, ОШ = 1,502); переменная омега3 (95% ДИ: 0,410–7,688, ОШ = 1,776); переменная кальция (95% ДИ: 0,041–3,738, ОШ = 0,391); переменная кальция (95% ДИ: 0,041–3,738, ОШ = 391); переменная multiVIT (95% ДИ: 0,211–5,645, ОШ = 1,090); Переменная витамина C (95% ДИ: 0,000–0,000, ОШ = 0,000); переменная витамина E (95% ДИ: 0,000–0,000, ОШ = 0,000); были включены интервалы. Статистически значимых многомерных ассоциаций ($P > 0,05$) между объясняющими переменными инфицирования COVID-19 не выявлено. Единственная статистически достоверная корреляция обнаружена между употреблением таблеток железа и заражением COVID-19 ($P = 0,025$). Контроль переменных или выявление причинно-следственных связей невозможно из-за наблюдательного характера исследования. Результаты нельзя строго экстраполировать на другие регионы мира, поскольку когортная выборка была ограничена жителями Ирана.

Ключевые слова: витамин, минерал, COVID-19, когортная популяция, Иран, логистическая регрессия.

Introduction

The COVID-19 disease started in December 2019, and in a short period, the coronavirus spread worldwide as a pandemic [12]. By February 26, 2021, it had infected more than 113 million people in 200 countries, of whom 2.5 million had died [4]. The clinical spectrum of SARS-CoV-2 infection appears to be broad and includes asymptomatic infection, mild upper respiratory tract disease, severe viral pneumonia with respiratory failure, gastrointestinal problems, and even death [26].

The SARS-CoV-2 coronavirus enters the cells through the binding of its surface glycoproteins called spikes to the special cell receptor called angiotensin-converting enzyme 2. This enzyme belongs to the group of kinases and is found in different parts of the body. Still, the most common place of its accumulation is in the endothelium of the lungs' capillaries. The mentioned virus enters the respiratory epithelial cells through this receptor [16]. Breathing problems occur when the infection affects the lungs, causing pneumonia, and death is possible due to these symptoms in infected people. Despite the wide spread of this disease, the incidence of different people in different societies is not the same, and even the severity of the conflict is different for different people. The role of various factors, including weight and BMI level, is among the factors that have been considered effective in reducing the possibility of conflict and disease occurrence [19].

In addition, the role of the immune system in preventing conflict or reducing the symptoms of conflict has been mentioned in various studies. Also, the importance of nutritional sufficiency in terms of vitamins and minerals for strengthening the immune system is a very important and controversial issue that has been discussed separately in various

studies. For example, Tipas et al. showed that a severe reduction of plasma vitamin A levels is significantly associated with ARDS and mortality in Corona disease [23]. Also, in a meta-analysis conducted by Kaya et al., it was shown that the possibility People who have low serum vitamin D levels are 1.64 times more likely to get COVID-19, and people who have serum 25(OH)D levels less than 20 ng/ml or 50 nmol/l are 2.42 times more likely to get COVID-19 [14]. Regarding vitamin C, several epidemiological studies show that adult patients with COVID-19 who had ARDS criteria according to the Berlin definition (up to 82% in one study) had low amounts of vitamin C [7, 24]. It has been shown that vitamin C increases resistance to infection caused by the coronavirus [2, 7]. In this regard, other studies showed that patients with severe COVID-19 have low levels of omega-3 in their blood [1, 18]. Many epidemiological studies have shown that low consumption of essential minerals in the diet plays an important role in preventing and reducing cardiovascular and cerebrovascular diseases [1, 15]. Therefore, the consumption of vitamin and mineral supplements to prevent infection in the post-corona period has increased to a great extent.

Dietary supplements are one of the widely used products that have been increasingly used in different societies in recent years, especially after the Corona virus. The wide variety and the claims made about the beneficial effects of these products have created a market of more than 30 billion dollars for these products in America. Recent evidence indicates that more than 50% of American people use at least one type of these products. In addition, 10% of people admit to consuming at least four types of these products.

Considering the prevalence of non-communicable diseases as a global problem, especially types of cancer and cardiovascular diseases, as the main causes of death, it has been proposed that the use

of vitamin-mineral supplements in the prevention of these diseases can be effective.

Previous clinical studies have implied that COVID-19 leads to diverse cardiovascular complications [8, 13, 21]. Preexisting cardiovascular diseases might be more susceptible to COVID-19 — induced heart injury [5].

However, the beneficial effects of preventive consumption of vitamin supplements in the prevention of these diseases have been discussed and doubted a lot in recent years, especially in people with a quality diet [10].

Based on this, due to the high preventive consumption of supplements in society, this study aims to investigate the hypothesis that the history of taking vitamin and mineral supplements for at least 6 months was effective in the initial infection of COVID disease in 2020 or not. Based on this, the present study was designed with the aim of investigating the association between the history of vitamin and mineral supplement consumption and the possibility of contracting the COVID-19 disease in the population of the Sabzevar cohort in Iran in 2020.

Materials and methods

This retrospective cohort study was conducted on 4241 people registered in the Sabzevar cohort system in 2020.

After approving the plan and obtaining the code of ethics, the required variables for the study were obtained from the Sabzevar Persian Cohort Center. Also, information about the patients with Corona until the end of 2020 in the Persian cohort population was obtained from the information registration centers of the patients with COVID-19 at the hospital and health center.

Samples of this population who had a history of taking vitamin and mineral supplements (at least for 6 months) (including vitamins D, E, A, and C and minerals including Fe, Ca, and Selenium) in the case group and the control group from the population without history of supplement use were selected. Assimilation of confounding variables such as age, gender, etc. is done with each person in the case group. The rate of infection with COVID-19 until the end of 2019 was compared in two groups.

The method of measuring each variable based on the national cohort protocol was presented on the Persian Cohort Sabzevar website (<https://www.medsab.ac.ir/index.aspx?siteid=1&pageid=6037>). The method of scoring the above variables was stated in the Cohort Country Checklist (Cohort Data Dictionary).

People with a positive PCR test should be considered infected with COVID. Also, inpatients included all patients admitted to the hospital. The obtained data were analyzed based on the objectives of the study using statistical tests. Confidentiality of information and characteristics of people were observed in the research.

The data of the studied population was analyzed statistically after entering software. The description of the variables was based on the type of variable (quantitative-qualitative) using descriptive indicators (mean, standard deviation, frequency, and frequency percentage). To analyze the quantitative variables, the normality of the variables in the groups was determined using the Shapiro-Wilk test. Then, if the variable was normal, the independent t-test was used, and if the variable was not normal, the Mann-Whitney test was used. To compare the distribution of qualitative variables in the groups, a chi-square test or, if necessary, a Fisher's exact test was used. Also, a 95% CI was reported to check the risk factors. The software used was IBM SPSS 24.0, and a significance level of 0.05 was considered.

Results

The number of participants in this cohort study was 4241. The average age of the participants in the study was 49.22 ± 8.77 , body mass index (28.19 ± 4.73), education level (9.47 ± 4.89), and blood pressure (71.96 ± 10.537) (Table 1).

There was no statistically significant correlation between the use of supplements and multivitamins and the possibility of contracting the COVID-19 disease ($P > 0.05$). There was only a statistically significant correlation between the use of iron tablets and contracting COVID-19 ($P = 0.025$). (Table 2).

A logistic regression was performed to ascertain the multivariate association between demographic, health variables, and supplement use and the likelihood that participants were infected with COVID-19. We performed multivariate logistic regression analy-

Table 1. Mean, median and standard deviation of age, blood pressure, level pf education, body mass index of people in study

		RightDBP1	RightSBP1	Age	EducationYears	BMI
N	Valid	4184	4184	4241	4241	4202
	Missing	57	57	0	0	39
Mean		71.96	114.50	49.22	9.47	28.19444
Median		70.00	112.00	49.00	9.00	27.92284
Std. Deviation		10.537	17.034	8.770	4.897	4.733909
Minimum		0	0	35	0	14.569
Maximum		140	240	72	22	57.778

Table 2. Correlation between vitamins and supplements with COVID-19

Variable	Value	df	Pearson Chi-Square Asymptotic Significance (2-sided)
Calcium	0.003a	1	0.957
MultiVIT	0.919a	1	0.338
vitD	0.064a	1	0.800
omega3	0.622a	1	0.430
Vit A	0.333a	1	0.564
Vit E	0.342a	1	0.558
zinc	1.029a	1	0.310
Fe	5.027a	1	0.025
Vit C	0.291a	1	0.590
Taking at least one supplement	0.328a	1	0.567

ses to control for the possible confounders such as age, sex, BMI.

The age variable is the 95% CI of 0.927 to 1.056, or decreased odds (OR = 0.989). Exposure is associated with lower odds of being infected with COVID-19 and does not reach statistical significance. A p value of 0.741 is indicated in Table 3. The sex variable's 95% CI of 0.238 to 2.743 spans 1.0, indicating decreased odds (OR = 0.808). Exposure is associated with lower odds of being infected with COVID-19 and does not reach statistical significance. A p value of 0.733, indicated in Table 3.

The BMI variable's 95% CI of 0.927 to 1.056 spans 1.0, indicating decreased odds (OR = 0.953). Exposure is associated with lower odds of being infected with COVID-19 and does not reach statistical significance. A p value of 0.412 is indicated in Table 3. The vitamin D variable's 95% CI of 0.333 to 6.769 spans 1.0, indicating increased odds (OR.502).

Exposure to vitamin D was associated with higher odds of being infected with COVID-19, but there was no statistical significance. Table 3 shows a p value of 0.597. The omega3 variable's 95% CI of 0.410 to 7.688 spans 1.0, indicating increased odds (OR = 1.776). Exposure is associated with higher odds of being infected with COVID-19 but does not reach statistical significance. Table 3 shows a p value of 0.442.

The OR value of the vitE variable is 0.000 (95% CI: 0.000–0.000). Exposure does not affect the odds of being infected with COVID-19. Table 3 shows a p value of 0.999. The calcium variable, with a 95% CI of 0.0410 to 3.738, spans 1.0, indicating decreased odds (OR = 0.391). Exposure is associated with lower odds of being infected with COVID-19 and does not reach statistical significance. Table 3 shows a p value of 0.415. The multiVIT variable's 95% CI of 0.211 to 5.645 spans 1.0, indicating increased odds (OR = 1.090). Exposure is associated with higher odds of being infected with COVID-19 but does not reach statistical significance. Table 3 shows a p value of 0.442.

The ferrous variable's 95% CI of 0.166 to 3.398 spans 1.0, indicating decreased odds (OR = 0.750). Exposure is associated with lower odds of being infected with COVID-19 and does not reach statistical significance. Table 3 shows a p value of 0.709. The OR value of the VitC variable is 0.000 (95% CI: 0.000–0.000). Table 3 of the reference article shows a p value of 0.999.

The taking of at least one supplement variable (95% CI of 0.211 to 5.645 spans 1.0) increases the odds (OR = 1.074). Exposure is associated with higher odds of being infected with COVID-19 but does not reach statistical significance. Table 3 shows a p value of 0.932.

There were no statistically significant multivariate associations (p > 0.05) between the explanatory variables and infection with COVID-19 (Table 3).

Table 3. Logistic regression vitamin and supplement consumption with COVID-19

		Variables in the Equation							
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1*	age	-0.011	0.033	0.109	1	0.741	0.989	0.927	1.056
	sex	-0.213	0.623	0.117	1	0.733	0.808	0.238	2.743
	BMI	-0.049	0.059	0.672	1	0.412	0.953	0.848	1.070
	Calcium	-0.938	1.151	0.664	1	0.415	0.391	0.041	3.738
	multiVIT	0.086	0.839	0.011	1	0.918	1.090	0.211	5.645
	vitD	0.407	0.768	0.280	1	0.597	1.502	0.333	6.769
	omega3	0.574	0.748	0.591	1	0.442	1.776	0.410	7.688
	vitE	-18.624	16633.603	0.000	1	0.999	0.000	0.000	0.000
	ferrous	-0.287	0.771	0.139	1	0.709	0.750	0.166	3.398
	vitC	-16.496	24912.129	0.000	1	0.999	0.000	0.000	0.000
	Taking at least one supplement	0.071	0.831	0.007	1	0.932	1.074	0.211	5.474
Constant	-0.356	2.618	0.018	1	0.892	0.701			

Note. *Variable(s) entered on step 1: age, sex, education, BMI, WSI index, CalciumD, multiVIT, vitD, omega3, vitE, ferrous, vitC, Taking at least one supplement.

Discussion

This study was conducted with the aim of determining the association between the history of vitamin or mineral supplement consumption and the COVID-19 disease in the Iranian cohort population in 2020.

In our study, no correlation was found between age and the incidence of COVID-19, which is not consistent with other studies. In 2021 Irma Yupari-Azabache showed in a study that age is a risk factor for mortality (death) in patients hospitalized for COVID-19 [25].

In our study, no correlation was found between sex and the incidence of COVID-19, which is not consistent with other studies. Leanne Groban in 2020 [11] demonstrates that the intensity of the infection and its complications are more prominent in men. It has been postulated that the potential functional modulation of ACE2 by estrogen may explain the sex difference in morbidity and mortality.

In our study, no correlation was found between BMI and the incidence of COVID-19, which is not consistent with other studies. Naveed Sattar in 2020 [20] demonstrates high BMI is an independent risk factor for susceptibility to infection and requires further research.

In our study, no correlation was found between taking at least one supplement and the incidence of COVID-19, which is not consistent with other studies. RM Nimer, in 2022 [17], states that

there were no significant differences in the frequencies of severe illness and hospitalizations with the consumption of vitamin A, folic acid, vitamin B12, vitamin B complex, vitamin C, zinc, iron, selenium, calcium, magnesium, omega 3, and aspirin before the COVID-19 infection. Among the investigated nutrients, the use of vitamin D prior to the COVID-19 infection was associated with reduced disease severity and hospitalization. However, more studies are required to confirm this finding.

In our study, no correlation was found between the consumption of vitamin A and the incidence of COVID-19, which is not consistent with other studies. Tepasse et al. (2021), in a multicenter prospective observational cross-sectional study entitled "Vitamin A Plasma Levels in COVID-19 Patients: A Prospective Multicenter Study and Hypothesis" conducted on 40 patients, found a decrease in vitamin A levels Plasma was significantly associated with an increase in the level of inflammatory markers (CRP, ferritin and with markers of acute SARS-CoV-2 infection), a decrease in the number of lymphocytes, LDH, and in malignant patients, the level of vitamin A was significantly lower than in moderate patients [18] which is not consistent with our study, in our study there was no statistically significant relationship with the amount of vitamin A consumption and contracting COVID-19.

In our study, no correlation was found between the consumption of vitamin D and the incidence of COVID-19, which is not consistent with other studies. Kaya et al. (2021), in a systematic study and meta-analysis of observational studies entitled "The role of vitamin D deficiency in COVID-19, showed that the probability of contracting COVID-19 is 1.64 times higher in people who have low serum vitamin D levels, and people whose OH-D25 serum level was less than 20 ng/ml or 50 nmol/l were 42.2 times more likely to suffer from severe COVID [14]. which is not consistent with the results of our study, which can be attributed to the low sample size of Kaya's study. In a cohort study, Cereda et al. examined 129 hospitalized adult patients with COVID-19. In this study, they showed that, although very low levels of vitamin D are likely to be effective in the prognosis of a patient infected with COVID, moderate vitamin D deficiency does not play a role in the prognosis of a person infected with COVID [6].

In our study, no correlation was found between the consumption of vitamin C and vitamin E.

Minkyung Bae in 2020 [3] demonstrated that vitamin C increases antiviral cytokines and free radical formation, decreasing viral yield. It also attenuates excessive inflammatory responses and the hyperactivation of immune cells. Amir Dehghani-Samani 2020 [9] in a systematic review showed that among all vitamins, the roles of vitamin A, C, D, and E are more defined and maybe more effective on the immune system, which emphasizes the importance of vitamins in the prevention of several viral infections like COVID-19. Therefore, sufficient vitamin intake can be recommended to prevent viral infections like the COVID-19 infection.

In our study, no correlation was found between the consumption of Omega-3 and the incidence of COVID-19, which is not consistent with other studies. Fadiyah et al., in a systematic review entitled "Potential of Omega-3 Supplementation for Disease" of 211 studies published between January 31, 2020, and September 1, 2021, that focused on omega-3 fatty acids, showed that patients with COVID-19 severely have low levels of omega-3 in their blood, and omega-3 was considered to reduce the risk of CoV-SARS infection and the duration of symptoms, overcome renal and respiratory dysfunction, and increase the survival rate in COVID-19 patients [10].

In our study, no correlation was found between the consumption of vitamin C and the incidence of COVID-19, which is not consistent with other studies. Tomasa et al. (2021), in a prospective study titled "COVID-19: Up to 82% of critically ill patients had low levels of vitamin C", showed that in patients with ARDS related to COVID-19, vitamin C status is very low. In our study, there was no significant correlation between COVID-19 and vitamin C [24].

In our study, people who did not take iron tablets were more likely to be infected with COVID-19,

and iron consumption had a statistically significant relationship with COVID. Erin Suriawinata and colleagues [22] stated in their research titled “Iron and iron-related proteins in COVID-19” that iron-related changes in COVID-19 so far include anemia of inflammation, low serum iron levels (hypoferremia), transferrin saturation, and high levels of serum ferritin (hyperferritinemia), hepcidin, lipocalin-2, catalytic, and soluble iron. Transferrin receptor (in ICU patients). Hemoglobin levels can be low or normal, and compromised hemoglobin function has been suggested. The membrane-bound transferrin receptor may facilitate virus entry, thus serving as a potential target for antiviral therapy.

Serum iron and ferritin levels can predict hospitalization, severity, and mortality from COVID-19. Serum hepcidin and ferritin/transferrin ratio can predict the severity of COVID-19.

Conclusion

Controlling the variables or identifying causal correlations is not feasible due to the observational nature of the study. There is evidence of omitted variable bias, even though a large number of explanatory variables were modeled and adjusted for. Furthermore, simultaneity bias poses a risk in the absence of well managed modifications of the explanatory variables. As stated differently, variance was occurring simultaneously as opposed to separately or in dependence. Additionally, the sample and the population of inter-

est differed because this study used a cohort sample. It is not possible to properly extrapolate the results to Iran due to the cohort sample’s limited concentration on Sabzevar inhabitants.

Additional information

Acknowledgments. The authors would like to thank all the participants who kindly cooperated in the process of the study. We also want to thank the Deputy of Research and Technology of Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran for the Persian cohort data.

Funding. None.

Study registration. N/A.

Disclosure of interests. The authors declare that she has no conflict of interests.

Ethical approval. Ethical approval in this study, all procedures performed on human samples were conducted following the relevant guidelines and regulations of the Helsinki Declaration. The study protocol was approved by the Research Ethics Committee in Iran (IR.MEDSAB.REC.1401.081).

Informed consent. Written informed consent was obtained from the participants for publication of this research.

Data sharing. Data are available under reasonable request to the corresponding author. The data are not publicly available due to their containing information that could compromise the privacy of research participant.

References

1. Adebamowo S.N., Spiegelman D., Willett W.C., Rexrode K.M. Association between intakes of magnesium, potassium, and calcium and risk of stroke: 2 cohorts of US women and updated meta-analyses. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2015, vol. 101, no. 6, pp. 1269–1277. doi: 10.3945/ajcn.114.100354
2. Atherton J.G., Kratzing C.C., Fisher A. The effect of ascorbic acid on infection chick-embryo ciliated tracheal organ cultures by coronavirus. *Arch. Virol.*, 1978, vol. 56, no. 3, pp. 195–199. doi: 10.1007/BF01317848
3. Bae M., Kim H. Mini-Review on the Roles of Vitamin C, Vitamin D, and Selenium in the Immune System against COVID-19. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 22: 5346. doi: 10.3390/molecules25225346
4. Cao P., Song Y., Zhuang Z., Ran J., Xu L., Geng Y., Han L., Zhao S., Qin J., He D., Wu F., Yang L. Obesity and COVID-19 in Adult Patients With Diabetes. *Diabetes*, 2021, vol. 70, no. 5, pp. 1061–1069. doi: 10.2337/db20-0671
5. Cao Q., Lei H., Yang M., Wei L., Dong Y., Xu J., Nasser M., Liu M., Zhu P., Xu L., Zhao M. Impact of cardiovascular diseases on COVID-19: a systematic review. *Med. Sci. Monit.*, 2021, vol. 27: e930032. doi: 10.12659/MSM.930032
6. Cereda E., Bogliolo L., Klersy C., Lobascio F., Masi S., Crotti S., De Stefano L., Bruno R., Corsico A.G., Di Sabatino A., Perlini S., Montecucco C., Caccialanza R.; NUTRI-COVID19 IRCCS San Matteo Pavia Collaborative Group. Vitamin D 25OH deficiency in COVID-19 patients admitted to a tertiary referral hospital. *Clin. Nutr.*, 2021, vol. 40, no. 4, pp. 2469–2472. doi: 10.1016/j.clnu.2020.10.055
7. Chiscano-Camón L., Ruiz-Rodríguez J.C., Ruiz-Sanmartín A., Roca O., Ferrer R. Vitamin C levels in patients with SARS-CoV-2-associated acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care*, 2020, vol. 24, no. 1: 522. doi: 10.1186/s13054-020-03249-y
8. Clerkin K.J., Fried J.A., Raikhelkar J., Sayer G., Griffin J.M., Masoumi A., Jain S.S., Burkhoff D., Kumaraiah D., Rabbani L., Schwartz A., Uriel N. COVID-19 and cardiovascular disease. *Circulation*, 2020, vol. 141, no. 29, pp. 1648–1655. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046941
9. Dehghani-Samani A., Kamali M., Hoseinzadeh-Chahkandak F. The role of vitamins on the prevention and/or treatment of COVID-19 infection; a systematic review. *Mod. Care J.*, 2020, vol. 17, no. 3, pp. 1–13. doi: 10.5812/modernc.104740
10. Farshchi H.R., Madjd A., Malekzadeh R. Overview: Beneficial Effects of Multivitamin Mineral Supplements. *Govaresh*, 2019, vol. 24, pp. 6–11.
11. Groban L., Wang H., Sun X., Ahmad S., Ferrario C.M. Is Sex a Determinant of COVID-19 Infection? Truth or Myth? *Curr. Hypertens Rep.*, 2020, vol. 22, no. 9: 62. doi: 10.1007/s11906-020-01073-x
12. Hashim M.J., Alsuwaidi A.R., Khan G. Population Risk Factors for COVID-19 Mortality in 93 Countries. *J. Epidemiol. Glob. Health.*, 2020, vol. 10, no. 3, pp. 204–208. doi: 10.2991/jegh.k.200721.001

13. Hessami A., Shamshirian A., Heydari K., Pourali F., Alizadeh-Navaei R., Moosazadeh M., Abrotan S., Shojaie L., Sedighi S., Shamshirian D., Rezaei N. Cardiovascular diseases burden in COVID-19: Systematic review and meta-analysis. *Am. J. Emerg. Med.*, 2021, vol. 46, pp. 382–391. doi: 10.1016/j.ajem.2020.10.022
14. Kaya M.O., Pamukcu E., Yakar B. The role of vitamin D deficiency on COVID-19: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Epidemiol. Health*, 2021, vol. 43: e2021074. doi: 10.4178/epih.e2021074
15. Kumar P., Kumar M., Bedi O., Gupta M., Kumar S., Jaiswal G., Rahi V., Yedke N.G., Bijalwan A., Sharma S., Jamwal S. Role of vitamins and minerals as immunity boosters in COVID-19. *Inflammopharmacology*, 2021, vol. 29, no. 4, pp. 1001–1016. doi: 10.1007/s10787-021-00826-7
16. Mohsin F.M., Tonmon T.T., Nahrin R., Tithy S.A., Ame F.A., Ara I., Alam S.K.T., Pervej A.M.A., Shahjalal M., Hawlader M.D.H. Association Between Smoking and COVID-19 Severity: Evidence from Bangladesh. *J. Multidiscip. Health*, 2021, vol. 23, no. 14, pp. 1923–1933. doi: 10.2147/JMDH.S317603
17. Nimer R.M., Khabour O.F., Swedan S.F., Kofahi H.M. The impact of vitamin and mineral supplements usage prior to COVID-19 infection on disease severity and hospitalization. *Bosn. J. Basic. Med. Sci.*, 2022, vol. 22, no. 5, pp. 826–832. doi: 10.17305/bjbm.2021.7009
18. Nursyifa Fadiyah N., Megawati G., Erlangga Luftimas D. Potential of Omega 3 Supplementation for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Scoping Review. *Int. J. Gen. Med.*, 2022, vol. 11, no. 15, pp. 3915–3922. doi: 10.2147/IJGM.S357460
19. Samsami M., Mehravaran E., Tabarsi P., Javadi A., Arsang-Jang S., Komaki A., Taheri M., Ghafouri-Fard S. Clinical and demographic characteristics of patients with COVID-19 infection: Statistics from a single hospital in Iran. *Hum. Antibodies*, 2021, vol. 29, no. 1, pp. 49–54. doi: 10.3233/HAB-200428
20. Sattar N., McInnes I.B., McMurray J.J.V. Obesity Is a Risk Factor for Severe COVID-19 Infection: Multiple Potential Mechanisms. *Circulation*, 2020, vol. 142, no. 1, pp. 4–6. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047659
21. Srivastava K. Association between COVID-19 and cardiovascular disease. *IJC Heart & Vasculature*, 2020, vol. 29, no. 100: 583. doi: 10.1016/j.ijcha.2020.100583
22. Suriawinata E., Mehta K.J. Iron and iron-related proteins in COVID-19. *Clin. Exp. Med.*, 2023, vol. 23, no. 4, pp. 969–991. doi: 10.1007/s10238-022-00851-y
23. Tepasse P.R., Vollenberg R., Fobker M., Kabar I., Schmidt H., Meier J.A., Nowacki T., Hüsing-Kabar A. Vitamin A Plasma Levels in COVID-19 Patients: A Prospective Multicenter Study and Hypothesis. *Nutrients*, 2021, vol. 13, no. 7: 2173. doi: 10.3390/nu13072173
24. Tomasa-Irriguible T.M., Bielsa-Berrolca L. COVID-19: Up to 82% critically ill patients had low Vitamin C values. *Nutr. J.*, 2021, vol. 20, no. 1: 66. doi: 10.1186/s12937-021-00727-z
25. Yupari-Azabache I., Bardales-Aguirre L., Rodriguez-Azabache J., Barros-Sevillano J.S., Rodríguez-Díaz A. COVID-19 mortality risk factors in hospitalized patients: a logistic regression model. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 2021, vol. 21, pp. 19–27. doi: 10.25176/RFMH.v21i1.3264
26. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10299: 1038. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3

Авторы:

Горат Ф., доцент кафедры традиционной медицины, медицинский факультет, Сабзеварский университет медицинских наук, г. Сабзевар, Иран;

Гандж Бахш А., студент кафедры медицины, медицинский факультет, Сабзеварский университет медицинских наук, г. Сабзевар, Иран;

Атаи Дисфани Р., студент кафедры медицины, Сабзеварский университет медицинских наук, г. Сабзевар, Иран;

Боргабани Р., преподаватель кафедры эпидемиологии, кафедра здравоохранения, медицинский факультет, Сабзеварский университет медицинских наук, г. Сабзевар, Иран;

Джаламбадани З., доцент кафедры санитарного просвещения и пропаганды, кафедра общественной медицины, медицинский факультет, Сабзеварский университет медицинских наук, г. Сабзевар, Иран; доцент кафедры санитарного просвещения и пропаганды, кафедра исследовательского центра неинфекционных заболеваний, медицинский факультет, Сабзеварский университет медицинских наук, г. Сабзевар, Иран.

Authors:

Ghorat F., Associate Professor of Traditional Medicine, Department of Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran;

Ganj Bakhsh A., MD Student, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran;

Ataee Disfani R., Medical Student, Student Research Committee, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran;

Borghabani R., Instructor of Epidemiology, Non-Communicable Diseases Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran;

Jalambadani Z., Assistant Professor of Health Education and Promotion, Department of Community Medicine, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran; Assistant Professor of Health Education and Promotion, Department of Non-Communicable Diseases Research Center, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.

Поступила в редакцию 03.02.2024
Отправлена на доработку 06.04.2024
Принята к печати 18.05.2024

Received 03.02.2024
Revision received 06.04.2024
Accepted 18.05.2024

СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЙ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ПАЦИЕНТОВ С ПРОСТЫМ МАРГИНАЛЬНЫМ ГИНГИВИТОМ, ПЕРЕНЕСШИХ НОВУЮ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ

А.В. Лямин, А.В. Винник, М.А. Постников, С.В. Винник, Н.В. Попов, Д.В. Алексеев

ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия

Резюме. Структура стоматологической заболеваемости населения Российской Федерации свидетельствует о высокой частоте воспалительных заболеваний пародонта, которая варьирует в зависимости от возраста и сопутствующей патологии пациентов. Негативная возрастная динамика здоровья зубов актуализирует проблему сопутствующей патологии и требует постоянного мониторинга факторов риска воспалительных заболеваний пародонта. Недостаточное внимание уделено эндогенным факторам риска, таким как нервно-дистрофические нарушения, заболевания сердечно-сосудистой системы, лейкоз, анемии, заболевания желудочно-кишечного тракта, инфекционные заболевания и др. При этом фиксируется рост «новых» инфекций (HIV-инфекция, HCV-инфекция, лихорадка Эбола, новая коронавирусная инфекция) при повышении уровня других инфекционных заболеваний. Целью исследования является проведение оценки стоматологического и микробиологического статуса пациентов, перенесших новую коронавирусную инфекцию. Было проведено обследование 100 пациентов с диагнозом К 05.10 простой маргинальный гингивит, которые составили 2 группы: основную и контрольную. В основную группу вошли 75 пациентов, перенесшие новую коронавирусную инфекцию, в контрольную группу — 25 человек, не перенесшие новую коронавирусную инфекцию. Пациентам исследуемых групп была проведена микробиологическая диагностика содержимого десневого желобка и оценка стоматологического статуса. Индексную оценку проводили с применением упрощенного индекса гигиены полости рта Грина–Вермиллиона (ОНИ-S), индекса РМА (Pamа) и индекса кровоточивости десневых сосочков (РВІ). Объективно у пациентов наблюдались: наддесневые и поддесневые зубные отложения, гиперемия десны, отечность десневых сосочков. В лаборатории биособраный материал засеивали на расширенный перечень плотных питательных сред с целью выявления культурома содержимого десневого желобка. Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии. Проведенный нами анализ индексной оценки у пациентов основной и контрольной групп показал, что средние значения индексов у пациентов основной группы выше, чем у пациентов контрольной группы. На основании результатов микробиологического исследования статистически значимые различия по частоте встречаемости видов микроорганизмов были выявлены для 12 видов. Таким образом важной представляется разработка подходов к прогнозированию риска развития обострения хронического гингивита у пациентов на фоне новой коронавирусной инфекции.

Ключевые слова: заболевания тканей пародонта, микробиологическое исследование, COVID-19, простой маргинальный гингивит, пародонтопатогенные комплексы, орофарингеальная микробиота.

Адрес для переписки:

Алексеев Дмитрий Владимирович
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89,
Самарский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (917) 124-85-10. E-mail: d.v.alekseev@samsmu.ru

Contacts:

Alekseev V. Dmitriy
443079, Russian Federation, Samara, Chapaevskaya str., 89,
Samara State Medical University.
Phone: +7 (917) 124-85-10. E-mail: d.v.alekseev@samsmu.ru

Для цитирования:

Лямин А.В., Винник А.В., Постников М.А., Винник С.В., Попов Н.В., Алексеев Д.В. Стоматологический и микробиологический статус пациентов с простым маргинальным гингивитом, перенесших новую коронавирусную инфекцию // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 306–312. doi: 10.15789/2220-7619-DAM-17588

Citation:

Lyamin A.V., Vinnik A.V., Postnikov M.A., Vinnik S.V., Popov N.V., Alekseev D.V. Dental and microbiological status of COVID-19 convalescent patients with simple marginal gingivitis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 306–312. doi: 10.15789/2220-7619-DAM-17588

DENTAL AND MICROBIOLOGICAL STATUS OF COVID-19 CONVALESCENT PATIENTS WITH SIMPLE MARGINAL GINGIVITIS

Lyamin A.V., Vinnik A.V., Postnikov M.A., Vinnik S.V., Popov N.V., Alekseev D.V.

Samara State Medical University of Ministry of Health of Russian Federation, Samara, Russian Federation

Abstract. The pattern of dental morbidity in the population of the Russian Federation evidences about a high incidence of inflammatory periodontal diseases, which varies based on patient age and comorbidity. The negative age-related dynamics of dental health emphasizes the problem of concomitant pathology and requires constant monitoring of risk factors for inflammatory periodontal diseases. Insufficient attention is paid to endogenous risk factors, such as neurodystrophic disorders, diseases of the cardiovascular system, leukemia, anemia, gastrointestinal tract diseases, infections, etc. At the same time, the growth of “new” infections (HIV-infection, HCV-infection, Ebola fever, new coronavirus infection) is recorded with elevating level of other infectious diseases. The aim of the study is to assess dental and microbiological status of COVID-19 convalescent patients. A survey of 100 patients diagnosed with simple marginal gingivitis (ICD-10 code: K 05.10) was carried out consisting of the following groups: main group — 75 COVID-19 convalescent patients, control group — 25 COVID-19-negative subjects. All individuals underwent microbiological diagnostics for gingival groove contents and an assessed dental status. The index assessment was performed using the simplified Green-Vermillion Oral Hygiene Index (OHI-S), the PMA index (Parma) and the gingival papilla blood flow index (PBI). In the laboratory, the collected material was seeded onto expanded list of dense nutrient media. The identification of isolated microorganisms was carried out using MALDI-ToF mass spectrometry. Our analysis of the index assessment in both groups showed that the average values of the indices 1 month after the diagnosis of new coronavirus infection (ICD-10 code: U07.1) in main group are higher than in control group. Based on the results of a microbiological study, significant differences in the frequency of microbial species isolation were identified for 12 species. Thus, it is important to develop approaches to predicting development of chronic gingivitis and its exacerbation in COVID-19 patients.

Key words: *periodontal tissue diseases, microbiological examination, COVID-19, simple marginal gingivitis, peridontopathogenic complexes, oropharyngeal microbiota.*

Введение

Структура стоматологической заболеваемости населения Российской Федерации свидетельствует о высокой частоте воспалительных заболеваний пародонта, которая варьирует в зависимости от возраста и сопутствующей патологии пациентов. Негативная возрастная динамика здоровья зубов актуализирует проблему сопутствующей патологии и требует постоянного мониторинга факторов риска упомянутой группы заболеваний [1]. Недостаточное внимание уделено эндогенным факторам риска, таким как нервно-дистрофические нарушения, заболевания сердечно-сосудистой системы, лейкоз, анемии, заболевания желудочно-кишечного тракта, инфекционные заболевания и др. [2].

В настоящее время актуальным становится вопрос влияния новой коронавирусной инфекции на течение различных заболеваний. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) — заболевание, вызванное штаммом вируса SARS-CoV-2. COVID-19 протекает в различных формах — от бессимптомных до тяжелых с развитием пневмонии, полиорганной недостаточности и сепсиса [4, 5, 6, 7, 8].

Заболевания тканей пародонта являются серьезной проблемой в связи с высокой распространенностью и слабовыраженным симптоматическим течением на ранних стадиях, это объясняет несвоевременное обращение пациентов

к стоматологу. Интактный пародонт выявляется только у 12% людей [9].

Болезни пародонта являются полиэтиологичными. Микроорганизмы играют важную роль в развитии воспалительных заболеваний пародонта. Микробная масса зубных отложений расценивается как неспецифический этиопатогенетический фактор с высоким токсическим потенциалом, приводящий в итоге к развитию воспалительных заболеваний тканей пародонта [10, 11, 12]. Однако неизвестно участие микроорганизмов в возникновении данных заболеваний у пациентов, перенесших COVID-19.

Причиной развития заболеваний может стать и нарушение неспецифической резистентности, коморбидные и сопутствующие заболевания. Существует взаимосвязь между инфекционными заболеваниями и заболеваниями пародонта [13].

Приоритетным направлением при оценке микробиоты полости рта является выявление представителей пародонтопатогенных комплексов — активных участников патологических процессов тканей пародонта. При гингивите данная микробиота также имеет определенное значение, в том числе, как триггер в начале формирования воспаления [14]. Однако в последние годы в медицинской микробиологии все большее внимание уделяется вкладу в заболевания полости рта со стороны не только классических патогенов, но и дисбиотических изменений, в том числе изменений качествен-

ного состава нормальной орофарингеальной микробиоты, которая за счет антагонистического воздействия может значительно влиять на состав и активность основных пародонтопатогенных микроорганизмов. Выявление закономерностей в изменениях микробиоты и определение микробиологических предикторов для прогноза развития обострений заболеваний пародонта — перспективное направление в современной микробиологии и стоматологии.

Цель исследования — провести оценку стоматологического статуса и исследование микробиоты десневого желобка пациентов, перенесших COVID-19.

Материалы и методы

Проведено обследование 100 пациентов с диагнозом K05.10 простой маргинальный гингивит, которые составили 2 группы: основную (75 человек) и контрольную (25 человек). У пациентов основной и контрольной групп (у основной группы — через 3 недели после подтверждения диагноза новая коронавирусная инфекция U07.1) определяли стоматологический и микробиологический статус.

Возраст пациентов обеих групп составил от 18 до 44 лет (табл. 1). Ранее всем обследованным из основной группы был поставлен диагноз — U07.1. Коронавирусная инфекция легкой степени тяжести. Диагностика и лечение COVID-19 проводились согласно действующим приказам и рекомендациям. От всех исследованных пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Пациентам обеих групп была проведена микробиологическая диагностика содержимого десневого желобка и оценка стоматологического статуса.

Лабораторное обследование пациентов заключалось в сборе образца содержимого десневого желобка с помощью нового инструмента для сбора содержимого десневого желобка (патент на полезную модель RU 204 047). После выведения из ротовой полости инструмент с его

содержимым помещали в стерильную пробирку с тиогликолевой средой и транспортировали в бактериологическую лабораторию в изотермических условиях в течение 30 минут.

В лаборатории биоматериал со средой подвергался вортексированию в течение 1 минуты, далее с помощью одноразовой стерильной микробиологической петли материал засеивали на расширенный перечень плотных питательных сред с целью выявления культурома содержимого десневого желобка. В исследовании использовались следующие питательные среды: 5% кровяной агар с бараньей кровью (HiMedia, Индия), агар для выделения лактобактерий (HiMedia, Индия), агар для выделения вейлонелл (HiMedia, Индия), агар для анаэробов (HiMedia, Индия), универсальная хромогенная среда (BioRad, США), агар Сабуро (HiMedia, Индия). Посевы инкубировали при 37°C в течение 2 суток в аэробных условиях и до 5 суток в анаэробных. Анаэробные условия создавались с использованием газогенерирующих пакетов. Особенность культуромного исследования заключается в идентификации всех выросших колоний микроорганизмов. Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии на масс-спектрометре Microflex LT (Bruker, Германия). Количественную оценку микроорганизмов проводили с учетом разрешающей способности метода от 10² колониеобразующих единиц на 1 мл.

Клиническое обследование пациентов осуществлялось согласно карте обследования, в которой указывались данные пациента: возраст; пол; основной и сопутствующий диагноз; жалобы, анамнез жизни, анамнез заболевания; проведенное лечение по основному заболеванию; стоматологический статус пациента. При осмотре пациенты, перенесшие и не болевшие COVID-19 жаловались на неприятный запах изо рта, кровоточивость при чистке зубов и болезненность в области десен. Частота встречаемости жалоб указана в табл. 2. Объективно наблюдались: наддесневые и поддесневые зубные отложения, гиперемия десны, отечность

Таблица 1. Распределение пациентов основной и контрольной групп по полу

Table 1. Sex-related distribution of patients in main and control groups

Возраст (лет) Age (years)		Контрольная группа Control group		Основная группа Main group	
		Мужчины (n) Male	Женщины (n) Female	Мужчины (n) Male	Женщины (n) Female
18–44		9	16	33	42
Итого Total	абс./abs.	9	16	33	42
	%	36	64	44	56
Итого в группах/Total in groups		25		75	
Всего/Total		100			

Таблица 2. Частота встречаемости жалоб пациентов с простым маргинальным гингивитом в исследуемых группах

Table 2. The frequency of complaints of patients with simple marginal gingivitis in the studied groups

Жалобы Complaints	Частота проявления Frequency	
	Основная группа, абс. (%) Main group, abs. (%)	Контрольная группа, абс. (%) Control group, abs. (%)
Неприятный запах изо рта (галитоз) Unpleasant breath (halitosis)	10 (13,3)	4 (16)
Кровоточивость десны при чистке зубов Gum bleeding while teeth brushing	27 (36)	8 (32)
Кровоточивость десны при приеме пищи Gum bleeding while eating	8 (10,6)	0 (0)
Болезненность в области десен Soreness in the gum area	7 (9,3)	1 (6,6)
Сухость полости рта Mouth dryness	17 (22,6)	1 (6,6)

десневых сосочков. Индексную оценку проводили с применением упрощенного индекса гигиены полости рта Грина–Вермиллиона (ОНИ-S), индекса РМА (Рамга) и индекса кровоточивости десневых сосочков (РВИ).

Из табл. 2 видно, что пациенты основной группы чаще жаловались на кровоточивость десны при чистке зубов и при приеме пищи, болезненность в области десен и сухость в полости рта, чем пациенты контрольной группы.

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 2.4.3 (разработчик — ООО «Статтех», Россия). Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение процентных долей при анализе многопольных таблиц сопряженности выполнялось с помощью критерия хи-квадрат Пирсона. Различия между сравниваемыми выборками считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

Проведенный нами анализ индексной оценки показал, что среднее значение индекса ОНИ-S в основной группе составило — 0,9, в контрольной — 1,1, что соответствует удовлетворительному уровню гигиены полости рта; среднее значение индекса РМА (%) в основной группе составило — 18,3, в контрольной группе — 10,9, что соответствует легкой степени тяжести гингивита; среднее значение индекса РВИ в основной группе составило — 0,4, в контрольной — 0,3 (табл. 3).

При исследовании было выявлено значительное биологическое разнообразие микроорганизмов, выделенных от пациентов из всех исследуемых групп. Анализ микробиологического статуса показал, что в основной и контрольной группах был выделен 91 вид микро-

организмов, из которых 30% — клинически значимые. Следует отметить, что у пациентов были выявлены представители следующих пародонтопатогенных комплексов: «зеленый», «желтый», «оранжевый», «пурпурный» и «красный». Из «зеленого» пародонтопатогенного комплекса был выделен *Capnocytophaga ochracea*; из «желтого» пародонтопатогенного комплекса — *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*; из «оранжевого» пародонтопатогенного комплекса — *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus constellatus*; из «пурпурного» пародонтопатогенного комплекса — *Veillonella parvula*, *Actinomyces odontolyticus*; из «красного» пародонтопатогенного комплекса — *Porphyromonas gingivalis*.

Обсуждение

Определение пародонтопатогенной микробиоты является важным фактом возможности культуромных исследований для детекции данной группы микроорганизмов и актуализирует ее роль в развитии заболеваний тканей пародонта.

Таблица 3. Средние показатели индексной оценки у пациентов исследуемых групп

Table 3. The average value index in the studied groups

Индекс Index	Основная группа Main group n = 75	Контрольная группа Control group n = 25
Индекс ОНИ-S	0,9	1,1
Индекс РМА (%)	18,3	10,9
Индекс РВИ	0,4	0,3

Таблица 4. Частота встречаемости пародонтопатогенных комплексов в исследуемых группах

Table 4. The frequency of periodontopathogenic complex isolation in the studied groups

Микроорганизм Microorganism	Основная группа, абс. (%) Main group, abs. (%) n = 75	«Контрольная группа», абс. (%) Control group, abs. (%) n = 25	p
«Красный» комплекс "Red" complex			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4 (2,7)	0 (0,0)	0,574
«Оранжевый» комплекс "Orange" complex			
<i>Prevotella intermedia</i>	0 (0,0)	2 (4,0)	0,062
<i>Prevotella nigrescens</i>	2 (1,3)	2 (4,0)	0,261
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	6 (4,0)	0 (0,0)	0,340
<i>Streptococcus constellatus</i>	18 (12,0)	6 (12,0)	1,000
«Желтый» комплекс "Yellow" complex			
<i>Streptococcus mitis</i>	12 (16,0)	10 (40,0)	0,006
<i>Streptococcus gordonii</i>	14 (18,6)	7 (28,0)	0,022
<i>Streptococcus oralis</i>	49 (65,3)	20 (80,0)	0,001
<i>Streptococcus sanguinis</i>	28 (70,0)	17 (68,0)	< 0,001
<i>Streptococcus intermedius</i>	7 (17,5)	2 (8,0)	0,030
«Зеленый» комплекс "Green" complex			
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	0 (0,0)	2 (4,0)	0,062
«Пурпурный» комплекс "Purple" complex			
<i>Veillonella parvula</i>	14 (35,0)	13 (52,0)	0,003
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	12 (8,0)	2 (4,0)	0,337

Примечание. Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 2.8.8. Сравнение процентных долей выполнялось с помощью критерия хи-квадрат Пирсона, точного критерия Фишера.

Note. Addition — statistical analysis was carried out using StatTech v. 2.8.8 software. Percentage comparison was carried out using chi-squared Pearson's criterion, Fisher criterion.

Несмотря на факт выделения представителей различных пародонтопатогенных комплексов, в том числе и наиболее агрессивных «красного» и «оранжевого» вопрос о их однозначной роли в качестве этиологического агента в научной литературе остается открытым. Так, по данным некоторых авторов, представители пародонтопатогенных комплексов не всегда выделяются при гингивите и не коррелируют с развитием заболеваний тканей пародонта [15].

Данный факт подтверждается и в нашем исследовании. Несмотря на то, что в клиническом материале пациентов всех исследуемых групп были выделены микроорганизмы из «зеленого», «желтого», «оранжевого», «пурпурного» и «красного» комплексов, статистически значимые различия по частоте встречаемости видов микроорганизмов были выявлены только для шести видов (табл. 4). При этом были выявлены достоверные различия среди представителей нормальной орофарингеальной микробиоты, которая чаще всего не учитывается при проведении классического микробиологического исследования, в связи с отсутствием у ее представителей связи с заболеваниями полости рта (табл. 5).

Следующие микроорганизмы из пародонтопатогенных комплексов выявлены не были: *Tannerella forsythia*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium periodonticum*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter showae*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga sputigena*, *Campylobacter concisus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Из табл. 5 видно, что статистически значимые различия были выделены для следующих представителей нормальной орофарингеальной микробиоты: *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria elongata*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium durum*, *Neisseria subflava*, *Neisseria flavescens*.

Заключение

С учетом полученных данных важной представляется разработка подходов к прогнозированию развития хронического гингивита и его обострений у пациентов на фоне COVID-19. Осуществление данной задачи достигается путем повышения точности диагностики посредством комплексной оценки клинических и микробиологических характеристик

Таблица 5. Частота встречаемости видов микроорганизмов нормальной микробиоты, для которых были получены статистически значимые различия в основной и контрольной группах

Table 5. The frequency of significantly differed microorganisms isolated from normal microbiota in main and control groups

Микроорганизм Microorganism	Основная группа, абс. (%) Main group, abs. (%) n = 75	«Контрольная группа», абс. (%) Control group, abs. (%) n = 25	p
<i>Streptococcus oralis</i>	49 (65,3)	20 (80,0)	0,001
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	7 (9,3)	3 (12,0)	0,034
<i>Neisseria elongata</i>	12 (30,0)	6 (24,0)	0,002
<i>Streptococcus intermedius</i>	7 (17,5)	2 (8,0)	0,030
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	21 (28)	5 (20,0)	0,030
<i>Corynebacterium durum</i>	13 (17,3)	5 (20,0)	0,048
<i>Neisseria subflava</i>	24 (32)	12 (48,0)	0,015
<i>Neisseria flavescens</i>	20 (26,6)	11 (44,0)	0,008
<i>Streptococcus sanguinis</i>	32 (42,6)	17 (68,0)	< 0,001
<i>Streptococcus mitis</i>	12 (16)	10 (40,0)	0,006
<i>Streptococcus gordonii</i>	14 (18,6)	7 (28,0)	0,022
<i>Veillonella parvula</i>	18 (24)	13 (52,0)	0,003

Примечание. Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 2.8.8. Сравнение процентных долей выполнялось с помощью критерия хи-квадрат Пирсона, точного критерия Фишера.

Notes. Statistical analysis was carried out using StatTech v.2.8.8 software. Percentage comparison was carried out using chi-squared Pearson's criterion, Fisher criterion.

тканей пародонта, что позволяет проводить индивидуальный прогноз течения заболевания и его обострений, подбирать индивидуальное лечение, корректировать домашнюю гигиену пациента с применением контролируемой чистки зубов. Особенностью исследования является то, что в способе прогнозирования риска развития обострений хронического гингивита у пациентов, перенесших COVID-19, оценивается наличие видов микроорганизмов *Streptococcus oralis*, *Neisseria elongata*, *Streptococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium durum*, *Neisseria subflava*, *Neisseria flavescens*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Veillonella parvula* — 1 группа или отсутствие *Haemophilus parainfluenzae* — 2 группа. На основе полученных данных рассчитывают индекс риска развития обострений. В случае выделения

микроорганизмов из 1 группы или отсутствия микроорганизмов из 2 группы, присваивается 1 балл, затем баллы суммируются. Значение индекса более 3 свидетельствует о высоком риске развития обострений хронического гингивита у пациентов, перенесших COVID-19. Значение индекса менее или равное 3 свидетельствует об отсутствии риска.

Несмотря на то, что у пациентов, была выделена пародонтопатогенная флора, в нашем исследовании показана роль и представителей нормальной микробиоты в развитии и прогрессировании заболеваний тканей пародонта, которая является антагонистом пародонтопатогенной флоры. На начальных стадиях развития гингивита роль «красного» и «оранжевого» комплексов меньше, чем «желтого», «зеленого» и «пурпурного», которые являются иницирующими по развитию данной патологии.

Список литературы/References

1. Александрова Е.А., Казмирова Н.Е., Лепилин А.В., Шульдяков А.А. Оптимизация лечения пародонтита у больных туберкулезом // *Стоматология*. 2010. Т. 4. С. 25–27. [Aleksandrova E.A., Kazimirova N.E., Lepilin A.V., Shuldyakov A.A. Optimizing the treatment of periodontitis in patients with tuberculosis. *Stomatologiya = Stomatology*, 2010, vol. 4, pp. 25–27. (In Russ.)]
2. Грудянов А.И., Макеева М.К., Пятигорская Н.В. Современные представления об этиологии, патогенезе и подходах к лечению эндодонто-пародонтальных поражений // *Вестник РАМН*. 2013. Т. 68, № 8. С. 34–36. [Grudyanov A.I., Makeeva M.K., Pyatigorskaya N.V. Modern ideas about the etiology, pathogenesis and approaches to the treatment of endodontoperiodontal lesions. *Vestnik RAMN = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2013, vol. 68, no. 8, pp. 34–36. (In Russ.)]
3. Князева Э.Б., Туркутюков В.Б. Эпидемиология и этиология воспалительных заболеваний пародонта у работников железнодорожного транспорта // *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2014. Т. 13, № 57. С. 29–31. [Knyazeva E.B., Turkutyukov V.B. Epidemiology and etiology of parodontal inflammatory diseases at railway workers. *Tihookeanskiy medicinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2014, vol. 573, no. 57, pp. 29–31. (In Russ.)]
4. Мизиева С.М. Нуждаемость в лечении болезней пародонта среди школьников г. Нальчик // *Современные наукоемкие технологии*. 2009. Т. 9. С. 57–58. [Mizieva S.M. Needs in the treatment of periodontium diseases among schoolchildren of Nalchik. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii = Modern High Technologies*, 2009, vol. 9, pp. 57–58. (In Russ.)]

5. Сабирова А.И., Акрамов И.А., Рамазанова З.Д., Сергеева В.В., Ибишева Л.К. Современные аспекты эпидемиологических вопросов заболеваний тканей пародонта // The Scientific Heritage. 2021. Т. 73, № 2. С. 31–38. [Sabirowa A.I., Akramov I.A., Ramazanova Z.D., Sergeeva V.V., Ibisheva L.K. Modern aspects of epidemiological issues of periodontal tissue diseases. *The Scientific Heritage*, 2021, vol. 73, no. 2, pp. 31–38. (In Russ.)]
6. Фельдблюм И.В., Коза Н.М., Шкарин В.В., Ковалишена О.В. Новые инфекции: систематизация, проблемы, перспективы // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2013. Т. 4. С. 118–120. [Feldblyum I.V., Koza N.M., Shkarin V.V., Kovalishena O.V. New infections: systematization, problems, and prospects. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, vol. 4, pp. 118–120. (In Russ.)]
7. Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии — основной фактор возникновения и развития пародонтита // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2017. Т. 5. С. 102–112. [Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., Ippolitov E.V. Periodontal pathogenic bacteria are the main factor in the onset and development of periodontitis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, vol. 5, pp. 102–112. (In Russ.)]
8. Ющук М.В., Балмасова И.П., Николаева Е.Н., Арутюнов С.Д., Царев В.Н. Взаимосвязь ассоциаций пародонтопатогенных бактерий и развития гингивита у студентов медицинского вуза при академическом стрессе // Клиническая стоматология. 2017. Т. 2. С. 18–24. [Yushchuk M.V., Balmasova I.P., Nikolaeva E.N., Arutyunov S.D., Tsarev V.N. The relationship of associations of periodontopathogenic bacteria and the development of gingivitis in medical students with academic stress. *Klinicheskaya stomatologiya = Clinical Dentistry (Russia)*, 2017, vol. 2, pp. 18–24. (In Russ.)]
9. Bae W.J., Shin M.R., Kang S.K., Zhang-Jun, Kim J.Y., Lee S.C., Kim E.C. HIF-2 Inhibition Suppresses Inflammatory Responses and Osteoclastic Differentiation in Human Periodontal Ligament Cells. *J. Cell. Biochem.*, 2015, vol. 116, no. 7, pp. 1241–1255. doi: 10.1002/jcb.25078
10. Chapple I.L.C., Mealey B.L., Van Dyke T.E., Bartold P.M., Dommisch H., Eickholz P., Geisinger M.L., Genco R.J., Glogauer M., Goldstein M., Griffin T.J., Holmstrup P., Johnson G.K., Kapila Y., Lang N.P., Meyle J., Murakami S., Plemons J., Romito G.A., Shapira L., Tatakis D.N., Teughels W., Trombelli L., Walter C., Wimmer G., Xenoudi P., Yoshie H. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Periodontol.*, 2018, vol. 89, no. 1, pp. 74–84. doi: 10.1002/JPER.17-0719
11. Chen N. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10223, pp. 507–513. doi: 10.1016/s0140-6736(20)30211-7
12. Gómez-Ochoa S.A., Franco O.H., Rojas L.Z., Raguindin P.F., Roa-Díaz Z.M., Wyssmann B.M., Guevara S.L.R., Echeverría L.E., Glisic M., Muka T. COVID-19 in health-care workers: a living systematic review and meta-analysis of prevalence, risk factors, clinical characteristics, and outcomes. *Am. J. Epidemiol.*, 2021, vol. 190, no. 1, pp. 161–175. doi: 10.1093/aje/kwaa194
13. Hasöksüz M., Kilic S., Saraç F. Coronaviruses and sars-cov-2. *Turk. J. Med. Sci.*, 2020, vol. 50, no. 9, pp. 549–556. doi: 10.3906/sag-2004-127
14. Hui D.S., I Azhar E., Madani T.A., Ntoumi F., Kock R., Dar O., Ippolito G., Mchugh T.D., Memish Z.A., Drosten C., Zumla A., Petersen E. The continuing 2019nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 91, pp. 264–266. doi: 10.1016/j.ijid.2020.01.009
15. Ibrahim N.K. Epidemiologic surveillance for controlling Covid-19 pandemic: types, challenges and implications. *J. Infect. Public Health*, 2020, vol. 13, no. 11, pp. 1630–1638. doi: 10.1016/j.jiph.2020.07.019

Авторы:

Лямин А.В., д.м.н., доцент, директор Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Винник А.В., ассистент кафедры терапевтической стоматологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Постников М.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой терапевтической стоматологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Винник С.В., к.м.н., ассистент кафедры ортопедической стоматологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Попов Н.В., д.м.н., доцент, зав. кафедрой стоматологии детского возраста и ортодонтии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Алексеев Д.В., студент института клинической медицины ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия.

Authors:

Lyamin A.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Director of Professional Center for Education and Research in Genetic and Laboratory Technologies, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;

Vinnik A.V., Assistant Professor, Department of Therapeutic Dentistry, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;

Postnikov M.A., DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Therapeutic Dentistry, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;

Vinnik S.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Therapeutic Dentistry, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;

Popov N.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;

Alekseev D.V., Student, Institute of Clinical Medicine, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation.

FORECASTING INFECTION FATALITY RATE OF COVID-19: MEASURING THE EFFICIENCY OF SEVERAL HYBRID MODELS

D. Seba^{a,b}, K. Belaïde^b

^a Higher School of Informatics, Sidi Bel Abbes, Algeria

^b University of Bejaia, Bejaia, Algeria

Abstract. The main goal of this paper is to delve into a crucial epidemiological metric the daily infection fatality rate in the context of the ongoing COVID-19 pandemic. The significance of understanding this metric lies in its potential to provide insights into the severity and impact of the virus on a daily basis. **Methods:** To achieve this overarching objective, we employ a comprehensive approach by applying various hybrid models that hybridize both machine learning and statistical techniques. In our pursuit of a deeper understanding, we leverage advanced machine learning algorithms, including Support Vector Machine and Random Forest. These techniques allow us to capture intricate patterns and relationships within the data, contributing to a more nuanced analysis of the infection fatality rate. The application of machine-learning models in epidemiological studies has gained prominence due to their ability to adapt to complex and evolving patterns inherent in infectious disease dynamics. Complementing our machine-learning arsenal, we integrate traditional statistical models such as ARIMA (AutoRegressive Integrated Moving Average), fractional ARIMA, and BATS (Bayesian Structural Time Series). **Results.** To assess the performance of these models, we employ key evaluation metrics, including Root Mean Squared Error (RMSE), Mean Squared Error (MSE), and Mean Absolute Error (MAE). These metrics serve as critical benchmarks, allowing us to quantify the accuracy and reliability of our models in predicting the daily infection fatality rate. A meticulous evaluation of model performance is crucial for ensuring the validity and of our findings. According to these measures, we see that hybrid models performed well especially ARIMA-RF model RMSE: 0.29, MSE: 0.084, MAE: 0.215 for the horizon 60 and for horizon 120 ARIMA-RF still the best performance, RMSE: 0.268, MSE: 0.071, MAE: 0.183, we get these results due to the capacity of this approach to handle complex patterns contrarily to other model ARIMA, BATS, RF and SVM. **Conclusion.** This work adopted this approach in order to build a model to predict infection fatality rate, we aspire to provide a nuanced understanding of the factors influencing the severity of the virus, ultimately contributing to the ongoing discourse on effective public health interventions and mitigation strategies.

Key words: epidemiology, infection fatality rate, forecast, statistical models, machine learning, performance, hybrid model.

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ УРОВНЯ ЛЕТАЛЬНОСТИ ПРИ COVID-19: ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ГИБРИДНЫХ МОДЕЛЕЙ

Себа Д.^{1,2}, Белаиде К.^{1,2}

¹ Высшая школа информатики, г. Сиди-Бель-Аббес, Алжир

² Университет Беджаи, г. Беджая, Алжир

Резюме. История вопроса. Основная цель этой статьи заключается в углублении понимания роли важнейшего эпидемиологического показателя — коэффициента летальности при заражении на фоне продолжающейся пандемии COVID-19. Важность понимания этого показателя состоит в том, что он позволяет ежедневно

Адрес для переписки:

Джиллали Себа
22016, Алжир, г. Сиди Бель Аббес, ул. 8 мая 1945 года,
Высшая школа информатики.
Тел.: +213-7-82-01-74-34. E-mail: d.seba@esi-sba.dz

Contacts:

Djillali Seba
22016, Sidi Bel Abbes, Algérie, Rue du 8 Mai 1945,
École Supérieure en Informatique.
Phone: +213-7-82-01-74-34. E-mail: d.seba@esi-sba.dz

Для цитирования:

Себа Д., Белаиде К. Прогнозирование уровня летальности при COVID-19: оценка эффективности некоторых гибридных моделей // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 313–319. doi: 10.15789/2220-7619-FIF-17548

Citation:

Seba D., Belaïde K. Forecasting infection fatality rate of COVID-19: measuring the efficiency of several hybrid models // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 313–319. doi: 10.15789/2220-7619-FIF-17548

© Seba D., Belaïde K., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-FIF-17548>

оценивать выраженность вирусного инфицирования и ее воздействие. *Материалы и методы.* Для достижения этой всеобъемлющей цели мы применяем комплексный подход, используя различные гибридные модели, объединяющие машинное обучение и статистические методы. Углубленное понимание значимости указанного параметра достигается с использованием передовых алгоритмов машинного обучения, включая машину опорных векторов и случайные деревья решений. Эти методы позволяют обнаруживать сложные закономерности и взаимосвязи в данных, способствуя более детальному анализу уровня смертности от инфекций. Применение моделей машинного обучения в эпидемиологических исследованиях приобрело известность благодаря их способности адаптироваться к сложным и развивающимся закономерностям, присущим динамике инфекционных заболеваний. Дополняя доступный арсенал машинного обучения, мы совмещаем традиционные статистические модели, такие как ARIMA (авторегрессионное интегрированное скользящее среднее), дробное ARIMA и BATS (байесовский структурный временной ряд). Эти модели обеспечивают проверенную временем и строгую статистическую основу для проводимого анализа, позволяя выявить временные зависимости и тенденции коэффициента летальности при заражении. Синергия машинного обучения и статистических моделей дает нашему исследованию целостную перспективу, обеспечивая надежное и всестороннее исследование эпидемиологической ситуации. *Результаты.* Для оценки эффективности этих моделей мы используем ключевые показатели оценки, включая среднеквадратическую ошибку (RMSE), среднеквадратическую ошибку (MSE) и среднюю абсолютную ошибку (MAE). Эти показатели служат важнейшими ориентирами, позволяя нам количественно оценить точность и надежность наших моделей при прогнозировании ежедневного коэффициента летальности при заражении. Тщательная оценка эффективности модели имеет решающее значение для обеспечения достоверности наших выводов. Согласно этим измерениям, гибридные модели показали хорошие результаты, особенно модель ARIMA-RF RMSE: 0.29, MSE: 0.084, MAE: 0.215 для горизонта 60 и для горизонта 120 ARIMA-RF по-прежнему демонстрировали лучшую производительность, RMSE: 0.268, MSE: 0.071, MAE: 0.183 позволили получить такие результаты благодаря способности этого подхода обрабатывать сложные шаблоны в отличие от моделей ARIMA, BATS, RF и SVM. *Заключение.* В данной работе применялся подход для построения модели по прогнозированию уровня коэффициента летальности при заражении, нацеленный на предоставление детального понимания факторов, влияющих на тяжесть вирусного инфицирования. В конечном итоге это будет способствовать продолжающемуся обсуждению эффективных мер общественного здравоохранения и стратегий нивелирования последствий.

Ключевые слова: эпидемиология, коэффициент летальности при заражении, прогноз, статистические модели, машинное обучение, производительность, гибридная модель.

Introduction

A highly contagious respiratory illness, COVID-19 caused by the SARS-CoV-2 virus was initially discovered in China, in December 2019, and since then, it has spread over the world.

This pandemic has had significant impacts on many aspects of life, including public health, the economy, education, and social interactions. For this reason, forecasting COVID-19 is an important tool in managing the pandemic, helping to minimize its impact and inform public health interventions.

Numerous researchers extensively explored this pandemic. For instance Alzahrani et al. [4] used ARIMA model to predict the spread of the pandemic, Dahesh et al. [8] treated the new cases using ARIMA model, Roy et al. [16] focused on spatial prediction. Note-worthy contributions also include the research conducted by Rath et al. [15], Chen [9], Lukman et al. [13], Yousaf et al. [23].

Numerous researchers have examined this phenomena through the application of genetic algorithm, such as the works of Deif et al. [10], Salgorta et al. [17], Acosta et al. [1].

The deep learning tools are also used to predict the new cases such as the work of Alazab et al. [3], Tamang et al. [19] Kapoor et al. [12] and Namasudra et al. [14] use neural networks, Zeroual et al. [24] make

a comparative study between different deep learning models, ArunKumar et al. [5] compared between statistical models ARIMA, seasonal ARIMA model and machine learning models Gated Recurrent unit (GRU), Long-Short term memory (LSTM).

IFR stands for infection fatality rate, which is the proportion of people who die from an infectious disease among all those who have been infected, was also estimated and forecasted in many works such as Singh et al. [18], Vattay et al. [22] Forecast the outcome and estimating the epidemic model parameters from the fatality time series. Ahmar et al. [2] use ARIMA and nonlinear AR model.

In the remainder of this paper we deal with forecasting daily IFR using hybrid models then we evaluate their effectiveness. In the second section we present both the data and the descriptive statistics, which provide insights into the behavior of the phenomenon. Moving on to the third section we elaborate the methodology employed in our study, The final section encompasses the implementation of our approach which includes statistical models (ARIMA, BATS) and hybrid models (ARIMA-SVM, BATS-SVM, BATS-RVM, ARIMA-Random Forest and BATS-Random Forest), These models are subsequently subjected to comparison using performance metrics such as RMSE, MSE, and MAE.

Materials and methods

Forecasting Models

ARIMA and ARFIMA model

Autoregressive integrated moving average (ARIMA) models predict future values based on past values, it gauges the strength of one dependent variable relative to other changing variables.

A stochastic process $(X_t)_{t \geq 0}$ is said to be an ARIMA(p, d, q) an integrated mixture autoregressive moving average model if it satisfies the following equation:

$$\phi(L)(1-L)^d X_t = \theta(L)\varepsilon_t \quad \forall t \geq 0 \quad (1)$$

where $d \in \mathbb{N}$, L is lag operator, $\varepsilon_t \sim N(0, \sigma^2)$ i.i.d. errors, with $\sigma^2 < \infty$.

$$\phi(L) = (1 - \phi_1 L - \dots - \phi_p L^p) \text{ with } \phi_p \neq 0$$

$$\theta(L) = (1 - \theta_1 L - \dots - \theta_q L^q) \text{ with } \theta_q \neq 0$$

– In the case of $d = 0$, we obtain ARMA(p, q) process;

– In the case of $d \in \mathbb{R}$, coincide with Fractional ARIMA(p, d, q) process.

BATS model

The BATS (Exponential smoothing state space model with Box-Cox transformation, ARMA errors, Trend and Seasonal components) model is a time series forecasting model that was proposed by De Livera et al. [11].

Box-Cox Transformation component is used to transform the data to achieve normality and stabilize the variance. The ARMA (Autoregressive Moving Average) Errors component is used to model the residuals of the time series data, which are assumed to be independent and identically distributed. Finally, the Seasonal component is used to model the seasonal patterns in the data.

Random Forest (RF)

The random forest for regression algorithm is a machine learning algorithm that combines multiple decision trees to predict continuous target variables. The algorithm works as follows: Select a random subset of the training data, with replacement.

Construct a decision tree for the subset of data by recursively partitioning the data into subsets based on the values of the input features. At each node, randomly select a subset of features to consider for splitting.

Repeat the previous steps to create multiple decision trees.

For prediction, pass the input data through all the decision trees and obtain the predicted target variable for each tree.

Aggregate the predictions of all trees to obtain the final prediction. This can be done by taking the average of the predicted values or using weighted averaging.

SVM model

Support vector machine (SVM) analysis is a popular machine learning tool for classification and regression, it is considered a nonparametric technique because it relies on kernel functions.

Given deviation data of training $x_i (i = 1, 2, \dots, m)$ where $x_i \in \mathbb{R}^n$ is the input vector with n -dimension, $y_i \in \mathbb{R}$ is the associated desired output value of x_i . Then the SVMs model is formulated as follows:

$$f(x) = w\phi(x) + b \quad (2)$$

Where $\phi(x)$ is called the feature that is non linearly mapping from the input space x . The w and b are coefficients that are estimated by minimizing the regularized risk function shown in formula:

$$\min \frac{1}{2} w^T w + C \sum_{i=1}^m L(y - f(x), x) \quad (3)$$

where C is the regularized constant determining the trade-off between the empirical error and the regularization term. The larger the constant C is, the more the minimum experience risk is emphasized, and the lower the generalization of function f .

Using the Lagrange function and duality theory, and with the kernel function $k(x, x)$ introduced, the function given in 3 can be transformed into a quadratic programming problem as follows:

$$\begin{aligned} \min \sum_{i,j=1}^m (\alpha_i - \alpha_i^*) (\alpha_j - \alpha_j^*) k(x_i, x_j) + \\ + \epsilon \sum_{i=1}^m (\alpha_i + \alpha_i^*) \sum_{i=1}^m y_i (\alpha_i - \alpha_i^*) \\ 0 \leq \alpha_i, \alpha_i^* \leq C, \end{aligned} \quad (4)$$

where α_i and α_i^* are Lagrange multipliers. They are obtained by solving this quadratic programming problem, and the input vector x_i corresponding the nonzero α_i and α_i^* is the support vector. Thus, we transform 6 the following equation:

$$f(x, \alpha_i, \alpha_i^*) = \sum_{i=1}^m (\alpha_i + \alpha_i^*) k(x_i, x_j) + b \quad (5)$$

$$i = 1, 2, \dots, m$$

Empirical results and discussion

Infection fatality rate (IFR) is a measure used to assess the proportion of infected individuals with fatal outcomes. Here is the formula used to calculate daily IFR for COVID-19:

$$\frac{\text{Number of daily new confirmed deaths}}{\text{Number of daily new confirmed cases}} \times 100 \quad (6)$$

Source of data: *World health organization*.

We have dealt with new cases and new deaths over the world from January, 3rd 2020 to March 16th 2023 Using (6), we calculate IFR index.

As shown in Fig. 1 the IFR is may appear higher in the first three months but it subsequently decreased significantly. This is due to the social awareness and

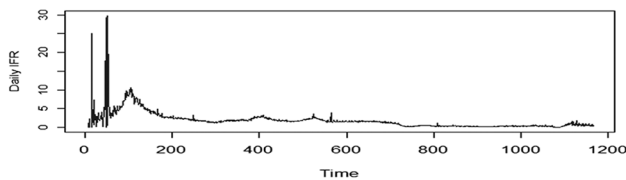


Figure 1. Daily IFR of COVID-19 from January, 3rd 2020 to March 16th 2023

the effective implementation of public health measures, such as mask mandates, social distancing, and lockdowns.

Two years into the pandemic, the IFR dropped significantly, approaching close to zero, largely due to widespread vaccination among the population, especially those at higher risk of severe illness, the overall death rate can decrease.

In the early stages of the pandemic, testing availability was limited, and many mild or asymptomatic cases went unreported. As testing capacity increases and more people get tested, health authorities can identify a larger proportion of mild cases.

Methodology

The methodology used in our work is to implement a statistical approach to model the data.

$$X_t = Y_t + U_t \tag{7}$$

X_t is decomposed into two parts linear component Y_t and nonlinear component U_t , we apply statistical models (ARIMA and BATS) which are more suited to linear pattern $\hat{Y}(t)$, then the difference $\varepsilon_t = X_t - \hat{Y}(t)$ is the residual.

The residual series ε_t contains the nonlinear parts, thus we use SVM and RVM to fit residuals gives the predicted values $\hat{U}(t)$, finally we combine the two predictive results to get:

$$\hat{X}(t)_t = \hat{Y}(t)_t + \hat{U}(t) \tag{8}$$

Results

We decompose the data into training data and test data, we use test data as horizon of forecasting to validate the results. We treat two cases, in the first case we use horizon of 60 days (short term) in other words the last 60 observations are test data. the second case horizon is 120 days (long term).

In Table 1 We provide a summary of how our data is described, we detect the missing values (Na’s). In this case the mean is close to the median it suggests that the data has a relatively symmetrical distribution, which can be a useful insight for understanding the central tendency and overall shape of the dataset.

Table 1. Descriptive statistics for Daily IFR

min	1stQu	Median	Mean	3rdQu	max	NA’s
0	0.373 9	1.5395	1.817 1	2.167 6	29.867 7	8

From Table 2 we can conclude some results about our data:

The primary purpose of the KPSS test is to check for the presence of a unit root in the time series data. A unit root indicates nonstationarity. If the test statistic is greater than the critical values at a chosen significance level, you fail to reject the null hypothesis, suggesting that the data is nonstationary and this is our case $0.01 < 0.05$.

Identifying nonstationarity is important because many time series forecasting models assume stationarity, and addressing nonstationarity may involve transformations or differencing to make the data suitable for modeling.

Kolmogorov–Smirnov test is a valuable statistical tool for assessing goodness of fit between a sample distribution and a theoretical distribution (Normal distribution in our case).

he primary utility of the Terasvirta test is to detect nonlinearities in time series data, instead of using linear models, you may choose to employ nonlinear modeling techniques and that is explain our choice to hybridize statistical models and machine learning models which handle nonlinear patterns.

The Hurst exponent serves as a valuable tool for evaluating whether long memory models are suitable candidates and for estimating the memory parameter in an ARFIMA model.

$d = H - 1/2$, thus $d = 0.49908$ which is close to 0.5, This proximity to 0.5 implies that ARFIMA model non-invertible suggesting that short memory process such as ARIMA more suitable to model our data.

From Figure 2 the ACF function did not decrease hyperbolically which confirm that short term memory model is a good candidate, and we remark clearly from the PACF function has a periodic component.

Handling missing values

We remove missing values (NA’s), it appears when the number of the new cases is 0, thus it is more accurate to replace missing values with zero’s.

ARIMA:

Due to the ARIMA model’s efficiency in analyzing time series, we first apply it. By using the Box-Jenkins approach and the Akaike Information Criterion (AIC) and Bayesian Information Criterion (BIC) to select the the best ARIMA model, which is in our case ARIMA (5,1,3), we obtain the following equation.

For the horizon of forecasting $h = 60, 120$.

$$(1+0.2104L-0.1261L^2-0.0137L^3-0.3397L^4-0.3157L^5)X_t = (1+0.7631L-0.0849L^2+0.269L^3)\varepsilon_t \tag{9}$$

We have used ARFIMA function to fit the model, we get a Fractional AutoRegressive model FAR(1,0.4998,2) the integrated fraction d is close to 0.5 which make the model not invertible.

We have used Maximum likelihood method to estimate the parameters of ARIMA and ARFIMA models.

BATS:

For the horizon $h = 60, 120$.

We perform BATS model, the output in R language is BATS (1, 1,4, -, -). The first is the ω parameter of the Box-Cox transform, the second is ARMA order of the errors, the third is ϕ trend damping, the fourth is the seasonal periods, which in your case are none. $\omega = 1$, meaning that indeed, there is no Box-Cox transformation.

ARMA order of errors is ARMA(1,4) with autoregressive coefficients 0.608 and moving average coefficients 0.658, 0.415, 0.369635, 0.52285 for the horizon $h = 120$.

SVM:

For the horizon $h = 60$.

SVM models have various hyperparameters that can be tuned using cross validation method, we have used epsilon regression which is tolerance error, we use also radial kernel $K(x_j, x_k) \exp(x_j x_k^2)$ it allows to capture nonlinear patterns. $\epsilon = 0.2$, gamma = 2, cost = 512.

For the horizon $h = 120$.

The best hyperparameters $\epsilon = 0.2$, cost = 4, gamma = 1

Random Forest:

For the horizon $h = 60$.

As Random forest is an ensemble of decision trees, thus the number of trees is 500 and mean of squared residuals is 3.001598.

For the horizon $h = 120$.

The number of trees is 500 and mean of squared residuals is 3.162188.

Forecasting Hybrid models

We treat the residuals of ARIMA with SVM then with Random Forest model in order to improve the forecasting results, we do the same thing with BATS-SVM and BAATS RVM.

We tune the hyperparameters using cross validation technique.

Table 2. Some characteristics of daily Infection Fatality Rate

Tests	Daily IFR	Comment
KPSS test	0.01	Non stationary
Kolmogorov-Smirnov Test	2.2e-16	Non normal
Terasvirta test	2.2e-16	Non linear
Hurst Exponent	0.99908	Short term memory

Illustration

Performance Measures

RMSE, MAE, and MSE are commonly used evaluation metrics in machine learning and statistics to assess the performance of models. They are used to measure the accuracy of predicted continuous values compared to the actual values.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - z_i)^2} \tag{10}$$

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - z_i)^2 \tag{11}$$

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (|y_i - z_i|) \tag{12}$$

Discussion

A small MAE means that our model is excellent at predictions, while a large MAE suggests that our model does not perform well at predictions. Unlike MSE, we do not square the residuals, thus MAE is more robust to outliers.

A higher MSE indicates that the model will be penalized for making predictions that significantly differ from the actual value. This means that a large difference between predicted and actual values will be more heavily penalized in MSE than in MAE. RMSE and MSE are sensitive to outliers.

We remark in Fig. 3 and 4 (see cover III) Hybrid models in two cases for $h = 60$ and $h = 120$ perform better than ARIMA and BATS because these models are linear and can not handle nonlinear pattern, contrarily SVM can treat nonlinear patterns due to its form of kernel, Random Forest has a good performance because it aggregate the results of many decision tree.

We are unable to make predictions using ARFIMA due to the parameter d being extremely close to 0.5 which makes the model non-invertible The advantage

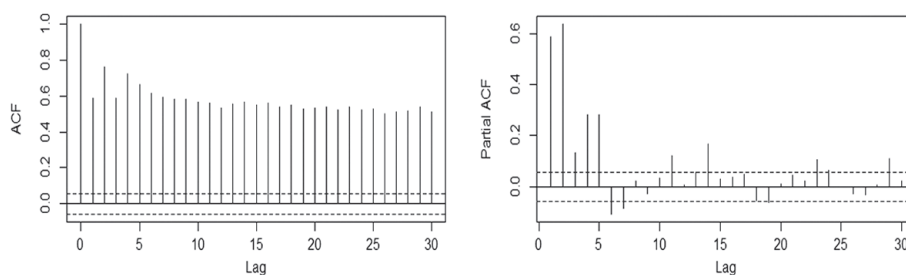


Figure 2. ACF and PACF for Daily IFR

Table 3. Performance Measures

h = 60	RMSE	MSE	MAE	h = 120	RMSE	MSE	MAE
ARIMA	0.367	0.135	0.248	ARIMA	0.369	0.136	0.272
ARFIMA	NaN	NaN	NaN	ARFIMA	NaN	NaN	NaN
BATS	0.388	0.151	0.265	BATS	0.363	0.132	0.289
SVM	0.362	0.131	0.243	SVM	0.345	0.129	0.266
RF	0.308	0.095	0.234	RF	0.377	0.142	0.278
BATS-SVM	0.345	0.119	0.251	BATS-SVM	0.345	0.129	0.264
BATS-RF	0.301	0.094	0.219	BATS-RF	0.360	0.094	0.289
ARIMA-SVM	0.324	0.105	0.216	ARIMA-SVM	0.342	0.117	0.266
ARIMA-RF	0.290	0.084	0.215	ARIMA-RF	0.268	0.071	0.183

of hybrid models is that we can deal with linear components (ARIMA and BATS) and nonlinear component (SVM and RF).

In Fig. 3 (see cover III), for $h = 120$, BATS has a good performance then ARIMA because it deals with short term memory phenomenon, same thing for BATS but this model can deal with complex pattern in time series such seasonal component and it assumes that there is a correlation between the errors.

In Fig. 4 (see cover III), for $h = 120$, ARIMA-RF has a good performance for the 60 days, but thereafter, its performance declines, primarily attributed to the limited memory capacity within Random Forest (RF) models.

Based on the performance measures in Table 3, it is evident that ARIMA-RF consistently demonstrates the superior performance in both scenarios.

Conclusion

To sum up, we have studied the behavior of daily IFR of COVID-19 using statistical models and machine learning models, we have fitted the values of daily IFR which help us to understand the phenomena. To improve the forecasting results we have put into practice hybrid models such as ARIMA-SVM, BATS-SVM, ARIMA-RF and BATS-RF, basing on performance measures ARIMA-RF is the best model.

Acknowledgement

We acknowledge the support of “Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique DGRSDT”.MESRS ALGERIA.

References

- Acosta-González E., Andrada-Félix J., Fernández-Rodríguez F. On the evolution of the COVID-19 epidemiological parameters using only the series of deceased. A study of the Spanish outbreak using Genetic Algorithms. *Math. Comput. Simul.*, 2022, vol. 197, pp. 91–104. doi: 10.1016/j.matcom.2022.02.007
- Ahmar A.S., Boj E. Application of neural network time series (Nnar) andarima to forecast infection fatality rate (ifr) of COVID-19 in Brazil. *International Journal on Informatics Visualization*, 2021, vol. 5, no. 1, pp. 8–10. doi: 10.30630/ijov.5.1.372
- Alazab M., Awajan A., Mesleh A., Abraham A., Jatana V., Alhyari S. COVID-19 prediction and detection using deep learning. *International Journal of Computer Information Systems and Industrial Management Applications*, 2020, no. 12, pp. 168–181.
- Alzahrani S.I., Aljamaan I.A., Al-Fakih E.A. Forecasting the spread of the COVID-19 pandemic in Saudi Arabia using ARIMA prediction model under current public health interventions. *J. Infect. Public Health*, 2020, vol. 13, no. 7, pp. 914–919. doi: 10.1016/j.jiph.2020.06.001
- ArunKumar K.E., Kalaga D.V., Kumar C.M.S., Kawaji M., Brenza T.M. Comparative analysis of Gated Recurrent Units (GRU), long Short-Term memory (LSTM) cells, autoregressive Integrated moving average (ARIMA), seasonal autoregressive Integrated moving average (SARIMA) for forecasting COVID-19 trends. *Alexandria Engineering Journal*, 2022, vol. 61, no. 10, pp. 7585–7603. doi: 10.1016/j.aej.2022.01.011
- Beran J. Statistics for long- memory processes. *CRC press*, 1994. Vol. 61. doi: 10.1201/9780203738481
- Box G.E., Jenkins G.M., Reinsel G.C., Ljung G.M. Time series analysis: forecasting and control; 5th ed. *John Wiley and Sons*, 2015. doi: 10.1002/9781118619193
- Dehesh T., Mardani-Fard H.A., Dehesh P. Forecasting of COVID-19 confirmed cases in different countries with ARIMA models. *MedRxiv*, 2020.03.13.20035345. doi: 10.1101/2020.03.13.20035345
- Chen J.M. Novel statistics predict the COVID-19 pandemic could terminate in 2022. *J. Med. Virol.*, 2022, vol. 94, no. 6, pp. 2845–2848. doi: 10.1002/jmv.27661
- Deif M.A., Solyman A.A., Hammam R.E. ARIMA model estimation based on genetic algorithm for COVID-19 mortality rates. *International Journal of Information Technology and Decision Making*, 2021, vol. 20, no. 6, pp. 1775–1798. doi: 10.1142/S0219622021500528
- De Livera A.M., Hyndman R.J., Snyder R.D. Forecasting time series with complex seasonal patterns using exponential smoothing. *Journal of the American statistical association*, 2011, vol. 106, no. 496, pp. 1513–1527. doi: 10.1198/jasa.2011.tm09771
- Kapoor A., Ben X., Liu L., Perozzi B., Barnes M., Blais M., O'Banion S. Examining COVID-19 forecasting using spatio-temporal graph neural networks. *arXiv*, 2020: 2007.03113 [Preprint]. doi: 10.48550/arXiv.2007.03113
- Lukman A.F., Rauf R.I., Abiodun O., Oludoun O., Ayinde K., Ogundokun R.O. COVID-19 prevalence estimation: Four most affected African countries. *Infect. Dis. Model.*, 2020, vol. 5, pp. 827–838. doi: 10.1016/j.idm.2020.10.002
- Namasudra S., Dhamodharavadhani S., Rathipriya R. Nonlinear Neural Network Based Forecasting Model for Predicting COVID-19 Cases. *Neural. Process. Lett.*, 2023, vol. 55, no. 1, pp. 171–191. doi: 10.1007/s11063-021-10495-w

15. Rath S., Tripathy A., Tripathy A.R. Prediction of new active cases of coronavirus disease (COVID-19) pandemic using multiple linear regression model. *Diabetes Metab. Syndr.*, 2020, vol. 14, no. 5, pp. 1467–1474. doi: 10.1016/j.dsx.2020.07.045
16. Roy S., Bhunia G.S., Shit P.K. Spatial prediction of COVID-19 epidemic using ARIMA techniques in India. *Model. Earth Syst. Environ.*, 2021, vol. 7, no. 2, pp. 1385–1391. doi: 10.1007/s40808-020-00890-y
17. Salgotra R., Gandomi M., Gandomi A.H. Time Series Analysis and Forecast of the COVID-19 Pandemic in India using Genetic Programming. *Chaos Solitons Fractals*, 2020, no. 138: 109945. doi: 10.1016/j.chaos.2020.109945
18. Singh A., Bajpai M.K. SEIHCARD Model for COVID-19 spread scenarios, disease predictions and estimates the basic reproduction number, case fatality rate, hospital, and ICU beds requirement. *Computer Modeling in Engineering & Sciences*, 2020, vol. 125, no. 3, pp. 991–1031. doi: 10.32604/cmescs.2020.012503
19. Tamang S.K., Singh P.D., Datta B. Forecasting of COVID-19 cases based on prediction using artificial neural network curve fitting technique. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 2020, vol. 6, special iss. (COVID-19), pp. 53–64. doi: 10.22034/GJESM.2019.06.SI.06
20. Tipping M. The relevance vector machine. *Advances in Neural Information Processing Systems 12*. 1999, pp. 652–658.
21. Vapnik V. The Nature of Statistical Learning Theory. *Springer, New York*, 1995.
22. Vattay G. Forecasting the outcome and estimating the epidemic model parameters from the fatality time series in COVID-19 outbreaks. *Phys. Biol.*, 2020, vol. 17, no. 6: 065002. doi: 10.1088/1478-3975/abac69
23. Yousaf M., Zahir S., Riaz M., Hussain S.M., Shah K. Statistical analysis of forecasting COVID-19 for upcoming month in Pakistan. *Chaos Solitons Fractals*, 2020, no. 138: 109926. doi: 10.1016/j.chaos.2020.109926
24. Zeroual A., Harrou F., Dairi A., Sun Y. Deep learning methods for forecasting COVID-19 time-Series data: A Comparative study. *Chaos Solitons Fractals*, 2020, no. 140: 110121. doi: 10.1016/j.chaos.2020.110121

Авторы:

Себа Д., д.мат.н., доцент, лаборатория прикладной математики, факультет математики, Высшая школа информатики, г. Сиди-Бель-Аббес, Алжир;

Белаиде К., д.мат.н., профессор, лаборатория прикладной математики, факультет математики, Университет Беджаи, г. Беджая, Алжир.

Authors:

Seba D., Doctor in Mathematics, Assistant Professor, Laboratory of Applied Mathematics, Department of Mathematics, Higher School of Computer Science (Ecole Supérieure en Informatique), Sidi-Belabbes, Algeria;

Belaïde K., Doctor in Mathematics, Full Professor, Laboratory of Applied Mathematics, Department of Mathematics, University of Bejaia, Bejaia, Algeria.

Поступила в редакцию 08.12.2023
Отправлена на доработку 06.04.2024
Принята к печати 07.04.2024

Received 08.12.2023
Revision received 06.04.2024
Accepted 07.04.2024

MOLECULAR GENETIC CHARACTERIZATION OF HEPATITIS B VIRUS IN BLOOD DONORS FROM SOUTH VIETNAM

Yu.V. Ostankova¹, H.K.T. Huynh², E.N. Serikova¹, A.N. Shchemelev¹, D.E. Reingardt¹, V.S. Davydenko¹, A.A. Totolian¹

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

² Ho Chi Minh Pasteur Institute, Ho Chi Minh City, Vietnam

Abstract. The problem of transfusion safety preventing parenteral viral hepatitis transmission remains relevant. Viral hepatitis B (HB) is the most common viral infection transmitted through transfusion procedures. One of the natural phases of a chronic viral hepatitis B (CHB) course is occult hepatitis B infection (OBI) characterized by undetectable HBsAg level (regardless of other serological marker levels) along with detected hepatic HBV DNA as well as blood viral load ranging from extremely low to undetectable. In Vietnam, prevention of transfusion-based HBV transmission is focused on donor screening; it is still based solely on HBsAg serology. As such, OBI remains a potential threat to blood transfusion safety. Assessing hepatitis B virus (HBV) DNA is a reliable preventive measure against HBV transmission from HBsAg– donors, especially in highly endemic regions. The aim of our work was HBV identification and molecular genetic characterization in blood donors from South Vietnam. The study material was presented by 500 donor serum samples. Subjects were examined for HBV markers with qualitative detection of HBsAg, HBs IgG, and HBcore IgG. Amplification and subsequent HBV sequencing were performed using nested PCR with overlapping primer pairs jointly flanking the complete HBV genome (S, P, C, X genes). Full-size HBV genome nucleotide sequences were obtained for 58 samples. Among blood donors, taking into account HBsAg+ and HBsAg– samples, HBV DNA was detected in 11.6%, including 8.6% OBI. HBV phylogenetic analysis showed genotypes B and C. Vaccine escape mutations and mutations that contribute to disease progression were identified. Current screening in Vietnam is insufficient for eliminating the risk of transfusion-transmitted HBV infection. The major risk factor is OBI. PCR testing for HBV should be considered for blood donor screening.

Key words: hepatitis B virus (HBV), hepatitis B viral markers, HBsAg-negative hepatitis B, genotypes, clinically significant mutations, blood donors, infection safety, South Vietnam.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГЕПАТИТА В У ДОНОРОВ КРОВИ ИЗ ЮЖНОГО ВЬЕТНАМА

Останкова Ю.В.¹, Хуинх Х.К.Т.², Серикова Е.Н.¹, Щемелев А.Н.¹, Рейнгардт Д.Э.¹, Давыденко В.С.¹, Тотолян А.А.¹

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

² Институт имени Пастера в г. Хошимин, г. Хошимин, Вьетнам

Резюме. Проблема инфекционной безопасности переливания крови с целью предупреждения передачи вирусов гепатитов является актуальной медицинской проблемой. Вирусный гепатит В (ГВ) остается наиболее

Адрес для переписки:

Останкова Юлия Владимировна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 921 353-81-73. E-mail: shenna1@yandex.ru

Contacts:

Yuliia V. Ostankova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 921 353-81-73. E-mail: shenna1@yandex.ru

Для цитирования:

Останкова Ю.В., Хуинх Х.К.Т., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Рейнгардт Д.Э., Давыденко В.С., Тотолян А.А. Молекулярно-генетическая характеристика вируса гепатита В у доноров крови из Южного Вьетнама // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 320–330. doi: 10.15789/2220-7619-MGC-17617

Citation:

Ostankova Yu.V., Huynh H.K.T., Serikova E.N., Shchemelev A.N., Reingardt D.E., Davydenko V.S., Totolian A.A. Molecular genetic characterization of hepatitis B virus in blood donors from South Vietnam // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 320–330. doi: 10.15789/2220-7619-MGC-17617

распространенной вирусной инфекцией, передающейся при переливании крови. Одной из естественных фаз течения хронического вирусного гепатита В (ХГВ) является скрытый гепатит В (СкГВ), характеризующийся неопределяемым уровнем HBsAg (независимо от содержания других серологических маркеров) при наличии ДНК вируса в ткани печени, а также вирусной нагрузкой в крови, варьирующей от крайне низкой до необнаруживаемой. Вьетнаме профилактика трансфузионной передачи вируса гепатита В (ВГВ) сосредоточена на скрининге доноров, который по-прежнему основан только на выявлении HBsAg. Таким образом, СкГВ остается потенциальной угрозой безопасности переливания крови. Определение ДНК ВГВ является надежной профилактической мерой против передачи вируса от доноров с HBsAg– ГВ, особенно в высокоэндемичных регионах. Целью нашей работы была идентификация и молекулярно-генетическая характеристика ВГВ у доноров крови из Южного Вьетнама. Материалом для исследования послужили 500 образцов плазмы крови, полученных от доноров. Субъекты были обследованы на наличие серологических маркеров ГВ с качественным определением HBsAg, антител анти-HBs IgG и анти-HBscore IgG, а также молекулярно-биологического маркера — ДНК ВГВ. Амплификацию и последующее секвенирование генома ВГВ проводили с помощью гнездовой ПЦР с перекрывающимися парами праймеров, совместно фланкирующих полный геном HBV (гены S, P, C, X). Полные нуклеотидные последовательности генома HBV были получены для 58 образцов. Среди доноров крови, с учетом HBsAg+ и HBsAg– образцов, ДНК ВГВ была обнаружена в 11,6%, в том числе в 8,6% случаев СкГВ. Филогенетический анализ ВГВ показал наличие генотипов В и С. Были выявлены мутации, приводящие к иммунологическому ускользанию, и мутации, способствующие прогрессированию заболевания. Проводимый в настоящее время во Вьетнаме скрининг недостаточен для устранения риска трансфузионной передачи ВГВ-инфекции. Основным фактором риска является СкГВ, в связи с чем высокочувствительное ПЦР-тестирование на ВГВ следует рассматривать как дополнительный приоритетный метод для скрининга доноров крови.

Ключевые слова: вирус гепатита В (ВГВ), маркеры вирусного гепатита В, HBsAg-негативный гепатит В, генотипы, клинически значимые мутации, доноры крови, инфекционная безопасность, Южный Вьетнам.

Introduction

One of the most common factors associated with liver disease is the hepatitis B virus (HBV). HBV transmission routes are associated with contact of mucous membranes with contaminated blood or other body fluids [38]. The incidence of chronic viral hepatitis B (CHB) is inversely proportional to the age of patients. Chronicity with infection under the age of 5 years exceeds 90%, whereas infection in adults leads to CHB in only 5% of cases. Approximately 20–30% of CHB patients develop cirrhosis and liver cancer. To date, about two billion people in the world have been infected with HBV and, according to various sources, from 290 to 360 million of them are sick with CHB. Moreover, only about 30.4 million patients are aware of their disease [37]. One natural form of CHB is occult hepatitis B infection (OBI) in which HBsAg is not detected in patient peripheral blood. However, the virus persists as a covalently closed circular DNA in hepatocytes. Therefore, HBV DNA is detected in the liver tissues and/or in the blood. Detection of OBI in blood is complicated by the extremely low viral load and limited sensitivity of diagnostic kits [27]. With OBI, the level of HBsAg in patient blood plasma is insignificant, and the viral load does not exceed 200 IU/ml (in most cases ≤ 25 IU/ml). As such, OBI prevalence values determined by different research teams vary. They depend on HBV prevalence in the study population as a whole, the HBV vaccination program in the

region, characteristics of the surveyed groups, risk factors, the sensitivity of the methods used, and single or multiple collection of samples [28].

The clinical significance of OBI remains under debate. On the one hand, certain conditions (a low viral load undetectable by routine diagnostic kits, absence of HBsAg in the blood) is precisely the outcome that is sought in the treatment of CHB. On the other hand, OBI is a risk factor for accelerated progression of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) in chronic viral hepatitis C (CHC) and other liver diseases of various etiology [18]. An increased risk of developing HCC in patients with OBI without other concomitant liver diseases has also been shown [30]. In addition, HBsAg-negative CHB leads to a high likelihood of viral reactivation during immunosuppression. Thus, reactivation was shown in almost 40% of patients receiving immunosuppressive therapy and/or chemotherapy for oncology and other diseases [9]. In this light, blood donors deserve special attention since the transfusion of blood and its products is a significant therapeutic strategy in various severe conditions; a donor with OBI can become a source of infection for recipients [6].

Since the infectious dose of HBV is approximately 3.5 IU/ml, highly specific and sensitive tests (lower detection limit 2–4 IU/ml) must be used to detect viral DNA in blood donors. In addition, it is desirable not to use minipools in diagnostics as they significantly reduce analytic sensitivity [7]. However, standardized controlled diagnostic meth-

ods do not currently exist, and general recommendations imply the use of PCR variations (nested-PCR, droplet digital PCR) aimed at amplifying at least two different HBV genomic regions. It is important that the analysis be equally effective for different viral genotypes and subtypes [27]. Underdiagnosis of HBV in risk groups and groups potentially associated with the viral spread (primarily blood donors) remains a serious obstacle to the elimination of viral hepatitis B as a threat to public health [38]. It is extremely important to determine OBI prevalence in global regions among healthy blood donors in order to assess the likelihood of HBV transmission through transfusion and to assess the need to modify donor selection strategies in relation to risk reduction. Subsequent genotyping of detected strains and identification of clinically significant mutations can serve as an important epidemiological tool for studying the ways in which the virus spreads.

One of the countries with the highest mortality from liver disease is the Socialist Republic of Vietnam (Vietnam). In this case, the main disease is hepatocellular carcinoma, caused by viral hepatitis [12]. The prevalence of CHB in patients with liver disease reaches 47% [16]. Prevention of HBV infection in Vietnam is based on the Newborn Universal Vaccination Program, as well as screening of blood donors for the presence of HBsAg. However, vaccination coverage rates have fluctuated in recent years, and detection of HBsAg is not sufficient to detect all cases of infection in blood donors [14]. The estimated CHB prevalence in Vietnam in 2019, depending on region, ranged from 8% to 25%, but these calculations are based on a limited number of studies. In addition, most studies assessing CHB prevalence in specific groups were based on detection of HBsAg and/or anti-HBcore IgG. The use of molecular genetic methods is limited not only in research, but also in routine laboratory diagnostics. The ability to detect infections with low viral loads is available only in central laboratories of large cities, or not available at all. Few works devoted to assessing OBI prevalence in the region use anti-HBcore IgG antibodies as a disease marker. Moreover, an analysis of cases with anti-HBcore antibodies only (which can be considered a surrogate marker of OBI in high-risk groups) is presented only in one study; it reported an extremely high (39.7%) level of this indicator [14]. Another research team, finding antibodies to HBcore in 50% of 110 HBsAg-samples in the absence HBV DNA, considered this to be evidence of a significant number of resolved HBV infections. This, however, may be explained by the relatively high HBV DNA detection limit of the method used (> 300 IU/ml) [13].

Thus, information on HBV prevalence among blood donors in Vietnam is limited in the literature,

and information on the prevalence of HBsAg-disease in this group is completely absent.

The aim of this work was identification and molecular genetic characterization of HBV among blood donors in the South Vietnam.

Materials and methods

The study was approved by the Ethics Committee of the Saint Petersburg Pasteur Institute. The study material was 500 blood plasma samples collected from blood donors in South Vietnam. All those examined denied an anamnesis of HBV infection. As part of the study, serological and molecular biological markers of CHB (HBsAg, anti-HBs IgG antibodies, anti-HBcore IgG, HBV DNA) were determined as described earlier [2]. Detection of HBV DNA in HBsAg- individuals was carried out using a technique that allows detection of the virus at a load of 3 IU/ml with a 500 μ l volume of extracted material [3]. As recommended by Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members, when the virus was detected, nested PCR was applied using a set of primers co-flanking the full viral genome, as shown previously [27, 1].

The primary analysis of the obtained fragments was performed using the BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) on the nucleotide sequences provided in the GenBank sequence database. The resulting sequences were aligned in the MEGA v.11 program using the ClustalW algorithm. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method; the significance of the tree was assessed using bootstrap analysis with 1000 replicates. The nucleotide sequences obtained were submitted to the HBVseq (<https://hivdb.stanford.edu/HBV/HBVseq/development/HBVseq.html>), HBVdb (<https://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/>) and Genafor (<https://hbv.geno2pheno.org>) databases to search for possible mutations. The amino acid sequence of the proteins was determined by translating the corresponding nucleotide sequence according to the open reading frame. The serotypes of the identified isolates, which characterized their antigenic specificity, were identified using the analysis of the nucleotide sequence of the conserved region of HBsAg α -determinant.

Statistical data processing was carried out using the Excel (Microsoft Corp.) and Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.) software packages. The "exact" Clopper-Pearson interval was used to estimate statistical uncertainty. Results are represented as a median (Me) indicating 95% confidence interval (95% CI). Depending on sample characteristics, the Fisher exact test or Yates-corrected Chi-Squared test was used to evaluate the statistical significance of numeric data obtained during paired comparison. A probability value of $p < 0.05$ was taken as the statistical significance threshold.

Results

The ages of the examined blood donors ranged from 18 to 64 years; the median age was 36.8 years. The number of men in the group exceeded the number of women: 59.2% and 40.8%, respectively. The mean age among women was 36.3 years. For men, it was 37.1 years. The sample distribution by age group and sex is shown in Fig. 1.

When evaluating HBV serological markers, prevalence among blood donors was determined to be 65.0% (95% CI: 60.64–69.18%). However, HBsAg was detected in only 3.00% (95% CI: 1.69–4.9%) of individuals. The HBV serological marker prevalence and distribution in blood donors are shown in Table 1.

Women represented 20% of HBsAg+ in the study group; the remaining 80% were men. HBsAg prevalence in men (4.05%; 95% CI: 2.11–6.97%) exceeded that in women (1.47%; 95% CI: 0.03–4.24%). However, there were no significant differences.

The prevalence of HBV DNA with a viral load above 200 IU/mL was 3.4% (95% CI: 1.99–5.39%), broadly consistent with the prevalence of HBsAg. An additional 43 HBsAg– blood donors were found to have viral DNA with a viral load of less than 25 IU/mL. Thus, OBI prevalence was 8.6% (95% CI: 6.29–11.41%). The prevalence of HBV DNA in the study group was 11.6% (95% CI: 8.93–14.74%). Most of the HBV samples were obtained from men, 81.03% (95% CI: 68.6–90.13%). The prevalence of viral DNA among men (15.88%; 95% CI: 11.91–20.55%) significantly exceeded that in women (5.39%; 95% CI: 2.72–9.44%): $\chi^2 = 11.948$, RR = 2.945, p = 0.0005, df = 1.

Phylogenetic analysis of HBV obtained from HBsAg+ individuals revealed a pre-dominance of the B genotype (80%; 95% CI: 51.91–95.67%) over the C genotype (20%; 95% CI: 4.33–48.09%). However, analysis of all HBV samples showed a smaller difference in the group between the B genotype (63.79%; 95% CI: 50.12–76.01%) and the C genotype (36.21%; 95% CI: 23.99–49.88%). With regard to subtype prevalence, the results were as follows: 56.9% B4; 18.97% C1; 6.9% B2; 8.62% C2; 5.17% C3; and 3.45%

C5. The nucleotide sequences of the complete HBV genomes (genotype B) examined in this work were submitted in the GenBank database (OP796800 — OP796836). The HBV subtype distribution depending on HBsAg detection is shown in Fig. 2.

Based on analysis of the conserved nucleotide sequence region of the HBsAg “a” determinant the viral serotypes characterizing antigenic specificity were determined (Table 2).

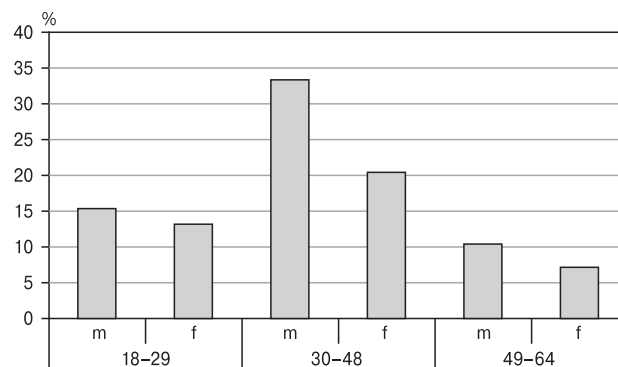


Figure 1. Age group and sex sample distribution
Note. M — male; F — female.

Table 1. HBV serological markers prevalence and distribution in blood donors (HBsAg, HBcore IgG, HBs IgG)

HBV serological marker prevalence	Number in the overall group (n = 500), share of the group, 95% Confidence Interval
HBsAg+	15 (3.00%, CI: 1.69–4.9%)
HBs IgG+	284 (56.8%, CI: 52.33–61.19%)
HBcore IgG+	149 (29.8%, CI: 25.82–34.02%)
Seronegative	175 (35.0%, CI: 30.82–39.36%)
HBV serological profile distribution	
HBsAg+	7 (1.4%, CI: 0.56–2.86%)
HBsAg+, HBcore IgG+	8 (1.6%, CI: 0.69–3.13%)
HBcore IgG+, HBs IgG+	115 (23.00%, CI: 19.38–26.94%)
HBcore IgG+ isolated	26 (5.2%, CI: 3.42–7.53%)
HBs IgG+ isolated	169 (33.8%, CI: 29.66–38.13%)

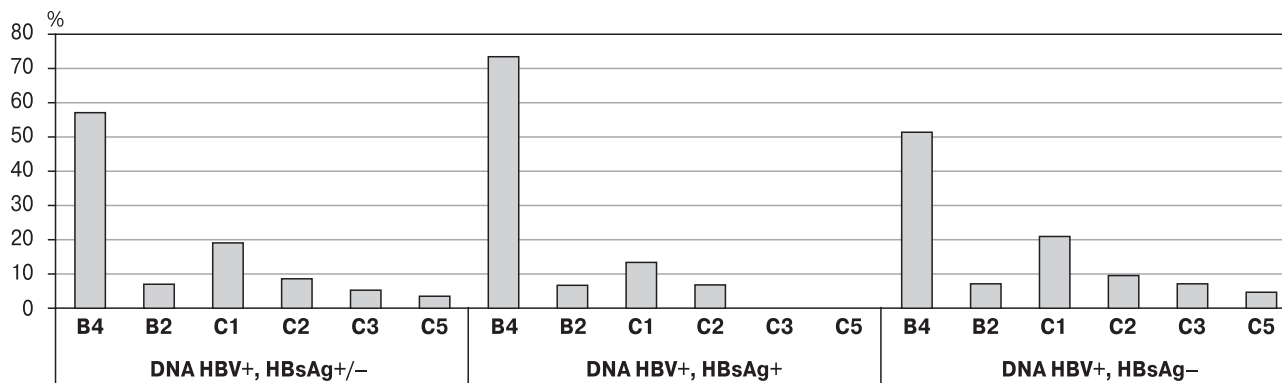


Figure 2. Distribution of HBV genotypes among HBsAg-positive and negative blood donor samples

Table 2. Distribution of hepatitis B subtypes and serotypes, according to the determinant “a” nucleotide sequence

Isolate	Subtype	Nucleotide sequence	Serotype
Viet_ocHBV_bd9	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd25	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd49	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_HBV_bd103	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd122	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd135	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd141	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd159	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_HBV_bd178	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_HBV_bd181	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_HBV_bd187	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_HBV_bd198	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd237	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_HBV_bd242	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd248	B4	AGAAAACTGCAACA	ayw3
Viet_HBV_bd253	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_HBV_bd266	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd268	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd277	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd285	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd294	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd310	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_HBV_bd324	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd350	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd353	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd383	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd385	B4	AGAAAACCTGCATCA	ayw1
Viet_HBV_bd426	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd456	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd471	B4	AGAAAACCTGCATCA	ayw1
Viet_ocHBV_bd481	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_HBV_bd491	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd498	B4	AGAAAACCTGCAACA	ayw1
Viet_ocHBV_bd154	B2	AAAAAACCTGCAACA	adw2
Viet_ocHBV_bd259	B2	AAAAAACCTGCAACA	adw2
Viet_HBV_bd327	B2	AAAAAACCTGCAACA	adw2
Viet_ocHBV_bd495	B2	AAAAAACCTGCAACA	adw2
Viet_ocHBV_bd3	C1	AAGAAACCTGCAACA	adw2
Viet_HBV_bd27	C1	AAGAGACCTGCAACA	adr
Viet_ocHBV_bd90	C1	AAGAGACCTGCAACA	adr
Viet_ocHBV_bd117	C1	AAGAAACCTGCAACA	adw2
Viet_HBV_bd201	C1	AAGAGACCTGCAACA	adr
Viet_ocHBV_bd282	C1	AAGAGACCTGCAACA	adr
Viet_ocHBV_bd287	C1	AAGAAACCTGCAACA	adw2
Viet_ocHBV_bd407	C1	AAGAGACCTGCAACA	adr
Viet_ocHBV_bd418	C1	AAGAGACCTGCAACA	adr
Viet_ocHBV_bd475	C1	AAGAGACCTGCAACA	adr
Viet_ocHBV_bd493	C1	AAGAGACCTGCAACA	adr
Viet_ocHBV_bd28	C2	AAGAGACCTGCAACA	adr
Viet_ocHBV_bd87	C2	AAGAGACCTGCAACA	adr
Viet_HBV_bd129	C2	AAGAGACCTGCAACA	adr
Viet_ocHBV_bd256	C2	AAGAGACCTGCAACA	adr
Viet_ocHBV_bd322	C2	AAGAGACCTGCAACA	adr

Isolate	Subtype	Nucleotide sequence	Serotype
Viet_ocHBV_bd167	C3	AAGAGACCTGCAACA	adr
Viet_ocHBV_bd371	C3	AAGAGACCTGTAACA	adr
Viet_ocHBV_bd427	C3	AAGAGACCTGCAACA	adr
Viet_ocHBV_bd60	C5	AAGAAACCTGCAACA	adw2
Viet_ocHBV_bd299	C5	AAGAAACCTGCAACA	adw2

Table 3. The most common clinically significant mutations identified in the examined blood donor group

HBV genome region	Mutation	Prevalence in overall group	Genotype; prevalence in genotype	Description
RT	S204L	1.72%	C1 (9.09%)	The mutation is not described. However, aa change at the position can be considered a possible mutation conferring resistance to lamivudine, telbivudine, and entecavir.
RT	V207M	12.07%	B4 (21.21%)	AA change at given position is a mutation conferring resistance to lamivudine.
MHR	Y100F	1.72%	C3 (33.33%)	Associated with HBsAg-negative CHB.
MHR	Q101K/H	6.9%	C1 (18.18%), C3 (66.67%)	Associated with HBsAg-negative CHB or genotype-specific polymorphism.
MHR	L109F	1.72%	B2 (25%)	Associated with HBsAg-negative CHB.
MHR	I110L	10.34%	B2 (25%), C1 (27.27%), C5 (100%)	Associated with HBsAg-negative CHB.
MHR	S114P	5.17%	B4 (9.09%)	Associated with HBsAg-negative CHB.
MHR	K122R	56.9%	B4 (100%)	Associated with HBsAg-negative CHB or genotype-specific polymorphism.
MHR	C124S/W	6.9%	B4 (6.06%), C1 (9.09%), C2 (20%)	Associated with HBsAg-negative CHB. Escape mutant (immune escape, vaccine escape, diagnostic escape). MHR is the most important antigenic determinant in envelope proteins and is composed of two loops bounded by disulfide bridges that are broken due to mutations in this genomic region. Substitutions in these regions can lead to a change in the three-dimensional conformation of the extravirion loop compared to wild-type strains. Some amino acid substitutions lead to surface antigen production differences.
MHR	I126T/N	18.97%	C1 (63.64%), C2 (40%), C5 (100%)	
MHR	P127T	1.72%	B4 (3.03%)	
MHR	Q129P	3.45%	B4 (6.06%)	
MHR	M133I/L	5.17%	B4 (9.09%)	
MHR	C139S	1.72%	B2 (25%)	
MHR	T140S	3.45%	B4 (6.06%)	
MHR	K141R	3.45%	B2 (50%)	
MHR	T143M	15.52%	B4 (27.27%)	
MHR	V184A	3.45%	B4 (100%)	
PreCore	T16I	3.45%	B4 (6.06%)	Suspected of being associated with severe disease in HBsAg-negative patients.
PreCore	L27P	13.79%	B4 (24.24%)	Suspected of being associated with severe disease in HBsAg-negative patients.
PreCore	W28* (G1896A)	15.52%	B4 (15.15%), B2 (25%), C2 (60%)	Negatively affects HBeAg production. Creates a stop codon (preventing HBeAg synthesis). Responsible for more than 90% of defective HBeAg secretion, affecting HBeAg serostatus.
PreCore	W28S/C	12.07%	B4 (12.12%), C1 (27.27%)	May be a transitional mutation to W28*.
Core	E113D	1.72%	C2 (20%)	Changes between aa 113 and 143 influence the antigenicity and stability of the particle. May create immune escape mutants leading to chronic viral persistence and severe liver disease. Located within B-cell epitopes, and is associated with disease progression, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma development.
Core	T128A	3.45%	B4 (6.06%)	
Core	P130T/L/S	27.59%	B4 (24.24%), B2 (25%), C1 (45.45%), C2 (40%)	
Core	P134Q	1.72%	C1 (9.09%)	
Core	P135Q/A	17.24%	B4 (24.24%), B2 (50%)	
Core	A137G	1.72%	B2 (25%)	

The donor group had high HBV amino acid variability in the PreCore, Core, and SHB regions. Mutation V207M, which is the cause of resistance to lamivudine, was identified in 12.07% (95% CI: 4.99–23.3%) of donors. Another amino acid substitution detected (S204L) may also be associated with resistance (lamivudine, entecavir, telbivudine). The most common clinically significant mutations present in the examined blood donor group are shown in Table 3.

Discussion

Studies on the prevalence of OBI among blood donors have long been scarce, but in recent years there have been more and more publications on the problem. The prevalence of this CHB form among blood donors in different countries varies depending on the HBsAg prevalence in the geographic region. Thus, among blood donors in Argentina, HBV was detected in only 0.06% samples, of which only four were HBsAg–. In contrast, OBI prevalence was 10.90% and 17.00% in the Lao People's Democratic Republic and Nigeria, respectively [26, 19]. Furthermore, reported OBI prevalence among donors often fluctuates within the same region, and the results of different research teams are contradictory. For example, in Iran, the prevalence values of HBsAg in the population and in blood donors are 2.60% and 0.40%, respectively, while OBI prevalence among donors exceeds 4.0% [4, 31, 35]. Thus, the data generally vary not only by region, but also by virus detection methods, which include a variety of commercial diagnostic kits for HBsAg and HBV DNA.

The prevalence values for HBsAg, anti-HBs IgG, and anti-HBcore IgG in the study group were 3.0%, 56.8%, and 29.8%, respectively. Thus, the detection of IgG antibodies to HBcore and HBs indicates contact with the virus in at least 29.8% of the examined blood donors, with markers present in 65%. Interestingly, the serological marker prevalence among blood donors that we found differs from that among adults in Vietnam generally. Thus, in Binh Thuan province, with a similar level of anti-HBs IgG prevalence (60.3%) to our data, the prevalence of anti-HBcore IgG was 71.7%; this is more than twice as high as the results obtained [12]. The same high prevalence of anti-HBcore IgG (68.2%) was shown earlier in Thai Binh province [24]. The reason for the differences with our results may be both a greater prevalence and risk of HBV infection in rural areas, alongside different factors in the blood donors we examined (lower risk of infection, higher standard of living and health). An indirect confirmation of this may be the significantly lower prevalence of HBsAg among blood donors compared with adult populations studied in Binh Thuan (15.3%) and in Thai Binh (19.0%) provinces [12, 24].

The detection of HBsAg in 3.0% of blood donors is significantly lower than the prevalence of this marker among apparently healthy people (12.3%) in Ho Chi Minh City [2]. However, it is approximately twice the prevalence this marker in blood donor cohorts in Vietnam. Despite the fact that until 2011 the prevalence of HBV among donors was practically the same as the prevalence in the general population, in the last decade it fell to 1.44% [15]. We assume that such a contradiction may be due to the high sensitivity (0.01 IU/mL) of the diagnostic kit used in this work. Note that HBsAg prevalence in certain risk groups, for example blood recipients, was 8–10% [15]. Apparently, HBV-infected blood donors with low blood levels of HBsAg, as well as HBsAg–, can serve as a source of infection. An indirect confirmation of this assumption is the high OBI prevalence (8.6%) in the study group.

Among the blood donors examined in this study, HBV DNA prevalence was 11.6%, which exceeds the figures presented by other research groups. We suggest that the most likely reason for this is the use a method in our study that allows the determination of viral DNA at low viral loads. The revealed higher prevalence of HBV DNA in men (15.88%) compared to women (5.39%) may be due to cultural features and freer conduct of men. OBI prevalence in different countries and global regions varies, but generally correlates with the prevalence of HBsAg+ CHB. In addition, in endemic countries, CHB (including OBI) is most common among low-income populations [32]. The high OBI prevalence revealed in this study is typical for regions highly endemic for HBV. This study included residents of the capital with a predominantly favorable socio-economic situation. As such, it can be assumed that the OBI prevalence among blood donors in rural areas will be higher.

As is known, the high mutation rate of HBV has led to the fact that the virus is currently divided into ten genotypes. One of them (genotype J) is phylogenetically positioned between the hepatitis B viruses of humans and monkeys. Nine others (genotypes A-I) differ from each other in nucleotide sequence by more than 8.0%. In addition, within a number of genotypes, subtypes have been described that differ by 4–7.5%. Each geographic region has its own HBV genotypic/subgenotypic profile. In most regions, one or two main genotypes and a limited number of subtypes circulate. This makes it possible to extract additional epidemiological information from data on prevalence and changes in viral genetic variants in a particular region and group [29]. At the same time, the genotypic/subgenotypic viral profile of a population can gradually change due to labor and tourist migration, as well as due to the use of prophylactic agents in some countries (or absence in others). For example, HBV vaccination is not a universal preventive measure, and screening

of blood donors in countries with different income levels differs in the laboratory diagnostic methods used [29].

According to a number of studies, genotypes and subtypes in HBsAg– CHB in a particular region, in most cases, correlate with those in the HBsAg+ form of the disease [15, 20]. It was shown that genotype B (71.43%) prevailed among patients with CHB in Vietnam compared to genotype C (27.55%) [33]. A similar prevalence of HBV genotypes was shown by us for HBsAg+ individuals: 80% B and 20% C. However, in a recent study of HBV genotypes in HCC patients in Vietnam, genotype B was detected in only 57.9% of patients and genotype C in 42.1% [17]. These results are close to those obtained by us for the entire cohort of blood donors (63.79% B, 36.21% C) and are almost identical to the results we obtained for HBsAg– individuals (58.14% B, 41.86% C).

Interestingly, even more differences have been noted in the distribution of HBV subtypes. Among patients with CHB, HBV subtype B4 prevailed (66.33%), followed by subtype C1 (26.53%), B2 (5.1%), C2 (1.02%), and C3 (1.02%) [33]. At the same time, only two subtypes were present in HCC patients. The frequencies in the HCC group were: B4 in 57.9% of patients; and C1 in 42.1% of patients [17]. Our results are similar regarding B4 frequency in HCC patients. Among the examined blood donors, B4 was present in 56.9% of cases. However, the B2 subtype was also detected (6.9%). This is similar to the frequency of this subtype in the population [33]. The C genotype subtypes we have identified differ in diversity compared to the previously presented data. The C1 subtype predominates (18.97% of patients), but the subtypes C2 (8.62%), C3 (5.17%), and C5 (3.45%) are also present.

When comparing the distribution of viral subtypes among HBsAg+ and HBsAg– samples from blood donors, there was no difference between groups. However, among individuals with OBI, a greater diversity of viral subtypes was seen. The greater diversity in our group of genotype C subtypes among OBIs (those with low viral load), is particularly interesting because genotype C in Vietnam is characterized by higher viral loads and more severe liver disease than genotype B [34]. However, the aforementioned predominance of genotype B in HCC patients compared to genotype C [17] casts doubt on these data. It is likely that insufficient methods (which do not permit detection of HBsAg– CHB) have limited the possibility of detecting cases of HBV genotype C when viral loads are not high. An indirect confirmation of this assumption is the higher frequency of the C genotype and diversity of subtype C genotypes in neighboring countries.

In Cambodia and Thailand, genotype C prevailed: 80.49% and 81.3%, respectively. Genotype B has been found in regions bordering Vietnam [21,

8]. The diversity of subtypes and recombinant forms of HBV in Laos, including such rare variants as B1, C5, I1, and I2 [5], may indicate a potential diversity HBV in regions of Vietnam, as evidenced by the high nucleotide sequence identity between some of the OBI cases we identified and samples from neighboring countries. However, we did not find B1, I1, or I2 genotypes among blood donors. Attention is drawn to HBV genotype C5, which is characteristic of Southeast Asia, but previously noted in Vietnam in only isolated cases [13]. The identification this subtype in such a limited OBI sample suggests a higher prevalence of HBV C5 in Vietnam than previously thought. Further OBI research in this geographic region is needed to confirm or refute this assumption. However, indirect confirmation is the fact that we previously detected HBV C5 among OBIs in HIV-infected individuals [2].

A consequence of high HBV variability is a variety of clinically significant viral mutations, including amino acid substitutions in the reverse transcriptase domain, which are defined as drug resistance mutations. Among the examined blood donors, mutations were found at two positions (204, 207) associated with resistance to antiretroviral drugs. The high prevalence of the V207M mutation (associated with lamivudine resistance) may become a public health problem in the future [10]. It should be noted that the V207M mutation was the most common (38%) among children with CHB and HBV genotype B, including those who had not previously received treatment [25]. Apparently, this mutation is characteristic of genotype B and is currently widespread in Vietnam.

Of particular interest are mutations in the MHR of HBsAg associated with the ability of the virus to elude neutralizing antibodies. Several dozen such mutations have been described so far [11]. The most common amino acid substitutions associated with vaccine/diagnostic escape and OBI include mutations at positions 123, 126, 129, 130, 133, 144, 145, and 181 [22, 36]. In this study, ten immune-associated escape mutations were identified among blood donors, with most of them leading to vaccine escape (Table 3). Some of these mutations are associated with failed diagnostics, and some with vaccine escape, leading to the possibility of infection of vaccinated people. Given the identification of such strains among blood donors, the problem of HBV spread in the region may be more global than it appears.

Indirect confirmation of this is the prevalence of escape mutations (8.1%) among patients with HCC [17]. Presumably, this may be due to high variability of determinant “a” in CHB patients with simultaneously detected HBsAg+ and anti-HBs IgG+, while the detection of anti-HBs IgG+ without HBsAg in most cases indicates the development of immunity against HBV [23]. The mechanism of this seems to be connected with the fact that amino acid substitutions

at positions 124–137 are able to influence natural and vaccine-induced antibodies to HBsAg.

Another widespread mutation in the blood donor group was a substitution in the PreCore region at position 1896. The prevalence of the W28* (G1896A) mutation, contributing to disease progression and HCC development, was 15.52%. In addition, W28S/C amino acid substitutions were found in 12.07% of individuals. We hypothesize that the W28S/C mutations are transitional mutations which may later become a stop codon W28*.

In blood donor samples, it is a serious challenge to identify HBV strains with: undetectable HBsAg; extremely low viral load; mutations that hinder vaccine-induced antibodies; drug resistance mutations; and/or mutations associated with disease development/progression. Such complex mutants presumably have an increased ability to overcome genetic barriers, thereby leading to the spread of drug-resistant viral variants in the population, despite universal vaccination.

Conclusion

Our work shows a high prevalence of CHB markers among blood donors in South Vietnam. The high incidence of OBI among blood donors indicates not only widespread HBsAg— forms of the disease in the population, but also surveillance shortcomings. The insufficiency of generally accepted analytic methods and/or inadequate sensitivity of diagnostic tests to detect CHB, requiring further attention and effective measures to ensure safe blood transfusion. The revealed hypervariability of the viral genome, multiple escape mutations, and mutations that contribute to disease progression, make it necessary to study distinguishing features of the pathogen and the host immune response in OBI. Highly sensitive PCR testing for CHB should be considered for blood donor screening in Vietnam.

Conflict of interest

All authors declare no conflict of interest.

References

1. Бумбали С., Серикова Е.Н., Балде Т.А.Л., Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Валутите Д.Э., Зуева Е.Б., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Аминокислотные замены в регионах CORE и HBsAg вируса гепатита В при моноинфекции и ВГВ/ВИЧ-коинфекции в Гвинейской Республике // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2021. Т. 13, № 3. С. 122–133. [Boumbaly S., Serikova E.N., Balde T.A.L., Ostankova Yu.V., Schemelev A.N., Valutite D.E., Zueva E.B., Semenov A.V., Totolian Areg A. Amino acid substitutions in core and HBsAg regions of hepatitis B virus in patients with mono-infection and HBV/HIV-coinfection in the Republic of Guinea. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2021, vol. 13, no. 3, pp. 122–133. (In Russ.)] doi: 10.22328/2077-9828-2021-13-3-122-133
2. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Валутите Д.Э., Хуйнх Х.К.Т., Егорова С.А., Тотолян Арег А. Распространенность маркеров вирусов гепатита В и С среди условно здоровых жителей южного региона Социалистической Республики Вьетнам // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1131–1140. [Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Serikova E.N., Schemelev A.N., Valutite D.E., Huynh H.K.T., Egorova S.A., Totolian Areg A. prevalence of hepatitis B and C viral markers among apparently healthy residents of the Socialist Republic of Vietnam (Southern Vietnam). *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1131–1140. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-TPO-1793
3. Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Метод выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке на основе гнездовой ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени // Клиническая лабораторная диагностика. 2022. Т. 67, № 9. С. 530–537. [Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Semenov A.V., Totolian Areg A. Method for detecting hepatitis B virus DNA in biological material at low viral load based on nested PCR with real-time detection of three viral targets. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2022, vol. 67, no. 9, pp. 530–537. (In Russ.)] doi: 10.51620/0869-2084-2022-67-9-530-537
4. Alavian S.M. Occult hepatitis B virus infection among hemodialysis patients. *Hepat. Mon.*, 2012, vol. 12, no. 4, pp. 242–243. doi: 10.5812/hepatmon.869.
5. Andernach I.E., Jutavijittum P., Samouny B., Yousukh A., Thammavong T., Hübschen J.M., Muller C.P. A high variability of mixed infections and recent recombinations of hepatitis B virus in Laos. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 2: e30245. doi: 10.1371/journal.pone.0030245.
6. Candotti D., Assennato S.M., Laperche S., Allain J.P., Levicnik-Stezinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut*, 2019, vol. 68, no. 2, pp. 313–321. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316490.
7. Candotti D., Laperche S. Hepatitis B virus blood screening: Need for reappraisal of blood safety measures? *Front. Med.*, 2018, vol. 5: 29. doi: 10.3389/fmed.2018.00029.
8. Chamni N., Louisirirochanakul S., Oota S., Sakuldamrongpanish T., Saldanha J., Chongkolwatana V., Phikulsood S. Genetic characterization and genotyping of hepatitis B virus (HBV) isolates from donors with an occult HBV infection. *Vox Sang.*, 2014, vol. 107, no. 4, pp. 324–332. doi: 10.1111/vox.12178
9. Cholongitas E., Haidich A.B., Apostolidou-Kiouti F., Chalevas P., Papatheodoridis G.V. Hepatitis B virus reactivation in HBsAg-negative, anti-HBc-positive patients receiving immunosuppressive therapy: a systematic review. *Ann. Gastroenterol.*, 2018, vol. 31, pp. 480–490. doi: 10.20524/aog.2018.0266.
10. Chu S.V., Vu S.T., Nguyen H.M., Le N.T., Truong P.T., Vu V.T.T., Phung T.T.B., Nguyen A.T.V. Fast and Sensitive Real-Time PCR Detection of Major Antiviral-Drug Resistance Mutations in Chronic Hepatitis B Patients by Use of a Predesigned Panel of Locked-Nucleic-Acid TaqMan Probes. *J. Clin. Microbiol.*, 2021, vol. 59, no. 10: e0093621. doi: 10.1128/JCM.00936-21.

11. Colagrossi L., Hermans L.E., Salpini R., Di Carlo D., Pas S.D., Alvarez M., Ben-Ari Z., Boland G., Bruzzone B., Coppola N., Seguin-Devaux C., Dyda T., Garcia F., Kaiser R., Köse S., Krarup H., Lazarevic I., Lunar M.M., Maylin S., Micheli V., Mor O., Paraschiv S., Paraskevis D., Poljak M., Puchhammer-Stöckl E., Simon F., Stanojevic M., Stene-Johansen K., Tihic N., Trimoulet P., Verheyen J., Vince A., Lepej S.Z., Weis N., Yalcinkaya T., Boucher C.A.B., Wensing A.M.J., Perno C.F., Svicher V.; HEPVIR working group of the European Society for translational antiviral research (ESAR). Immune-escape mutations and stop-codons in HBsAg develop in a large proportion of patients with chronic HBV infection exposed to anti-HBV drugs in Europe. *BMC Infect. Dis.*, 2018, vol. 18, no. 1: 251. doi: 10.1186/s12879-018-3161-2.
12. Do S.H., Yamada H., Fujimoto M., Ohisa M., Matsuo J., Akita T., Katayama K., Van Nguyen N., Miyakawa Y., Tanaka J. High prevalences of hepatitis B and C virus infections among adults living in Binh Thuan province, Vietnam. *Hepatol. Res.*, 2015, vol. 45, no. 3, pp. 259–268. doi: 10.1111/hepr.12350.
13. Dunford L., Carr M.J., Dean J., Nguyen L.T., Ta Thi T.H., Nguyen B.T., Connell J., Coughlan S., Nguyen H.T., Hall W.W., Thi L.A. A multicentre molecular analysis of hepatitis B and blood-borne virus coinfections in Viet Nam. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 6: e39027. doi: 10.1371/journal.pone.0039027.
14. Duong M.C., Le P.V., Pham O.N., Pham H.D., Nguyen T.B., Phan H.T. Patterns of hepatitis B virus exposure and associated predictors in Vietnam: a cross-sectional study. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2020, vol. 13, pp. 535–541 doi: 10.4103/1995-7645.296721
15. Flower B., Du Hong D., Vu Thi Kim H., Pham Minh K., Geskus R.B., Day J., Cooke G.S. Seroprevalence of Hepatitis B, C and D in Vietnam: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Reg. Health West Pac.*, 2022, no. 24: 100468. doi: 10.1016/j.lanwpc.2022.100468.
16. Gish R.G., Bui T.D., Nguyen C.T., Nguyen D.T., Tran H.V., Tran D.M., Trinh H.N. International Group for Liver Health in Viet N. Liver disease in Viet Nam: screening, surveillance, management and education: a 5-year plan and call to action. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2012, vol. 27, no. 2, pp. 238–247. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06974.x
17. Ho P.T., Balzanelli M.G., Distratis P., Lazzaro R., Tran D.K., Nguyen K.C.D., Bui T.M., Nguyen T.T., Pham S.T., Nguyen H.S.D., Tran V.T., Ho T.T., Dipalma G., Inchingolo F., Quek C., Pham H.T., Isacco C.G., Santacroce L., Pham V.H. Characteristics of Hepatitis B Virus Genotype and Sub-Genotype in Hepatocellular Cancer Patients in Vietnam. *Diagnostics (Basel)*, 2022, vol. 12, no. 10: 2393. doi: 10.3390/diagnostics12102393.
18. Ji D.Z., Pang X.Y., Shen D.T., Liu S.N., Goyal H., Xu H.G. Global prevalence of occult hepatitis B: a systematic review and meta-analysis. *J. Viral. Hepat.* 2022, vol. 29, pp. 317–329. doi: 10.1111/jvh.13660
19. Jutavijittum P., Andernach I.E., Yousukh A., Samountry B., Samountry K., Thammavong T., Keokhamphue J., Toriyama K., Muller C.P. Occult hepatitis B infections among blood donors in Lao PDR. *Vox Sang.*, 2014, vol. 106, no. 1, pp. 31–37. doi: 10.1111/vox.12073
20. Kishk R., Atta H.A., Ragheb M., Kamel M., Metwally L., Nemr N. Genotype characterization of occult hepatitis B virus strains among Egyptian chronic hepatitis C patients. *East. Mediterr. Health. J.*, 2014, vol. 20, no. 2, pp. 130–138.
21. Ko K., Takahashi K., Nagashima S., Yamamoto C., Ork V., Sugiyama A., Akita T., Ohisa M., Chuon C., Hossain M.S., Mao B., Tanaka J. Existence of hepatitis B virus surface protein mutations and other variants: demand for hepatitis B infection control in Cambodia. *BMC Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 1: 305. doi: 10.1186/s12879-020-05025-3
22. Kuhns M.C., Holzmayer V., Anderson M., McNamara A.L., Sauleda S., Mbanya D., Duong P.T., Dung N.T.T., Cloherty G.A. Molecular and Serological Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Positive Samples with Very Low or Undetectable Levels of HBV Surface Antigen. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 10: 2053. doi: 10.3390/v13102053
23. Magoro T., Gachara G., Mavhandu L., Lum E., Kimbi H.K., Ndip R.N., Bessong P. Serologic and genotypic characterization of hepatitis B virus in HIV-1 infected patients from South West and Littoral Regions of Cameroon. *Virol. J.*, 2016, vol. 13, no. 1: 178. doi: 10.1186/s12985-016-0636-x
24. Nguyen V.T., McLaws M.L., Dore G.J. Highly endemic hepatitis B infection in rural Vietnam. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2007, vol. 22, no. 12, pp. 2093–2100. doi: 10.1111/j.1440-1746.2007.05010.x
25. Phung T.T.B., Chu S.V., Vu S.T., Pham H.T., Nguyen H.M., Nguyen H.D., Le N.T., Nguyen D.V., Truong P.T., Vu V.T.T., Nguyen A.T.V. COLD-PCR Method for Early Detection of Antiviral Drug-Resistance Mutations in Treatment-Naive Children with Chronic Hepatitis B. *Diagnostics (Basel)*, 2020, vol. 10, no. 7: 491. doi: 10.3390/diagnostics10070491
26. Pisano M.B., Blanco S., Carrizo H., Ré V.E., Gallego S. Hepatitis B virus infection in blood donors in Argentina: prevalence of infection, genotype distribution and frequency of occult HBV infection. *Arch. Virol.*, 2016, vol. 161, no. 10, pp. 2813–2817. doi: 10.1007/s00705-016-2960-2
27. Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F., Lok A.S.; Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.*, 2019, vol. 71, no. 2, pp. 397–408. doi: 10.1016/j.jhep.2019.03.034
28. Saitta C., Pollicino T., Raimondo G. Occult Hepatitis B Virus Infection: An Update. *Viruses*. 2022, vol. 14, no. 7: 1504. doi: 10.3390/v14071504
29. Schweitzer A., Horn J., Mikolajczyk R.T., Krause G., Ott J.J. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet*, 2017, vol. 386, no. 10003, pp. 1546–1555. doi: 10.1016/S0140-6736(15)61412-X
30. Shi Y., Wu Y.H., Wu W., Zhang W.J., Yang J., Chen Z. Association between occult hepatitis B infection and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Liver Int.*, 2012, vol. 32, pp. 231–240. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02481.x
31. Smolle E., Zohrer E., Bettermann K., Haybaeck J. Viral hepatitis induces hepatocellular cancer: What can we learn from epidemiology comparing Iran and worldwide findings? *Hepat. Mon.*, 2012, vol. 12: e7879. doi: 10.5812/hepatmon.7879
32. Stasi C., Silvestri C., Voller F. Emerging Trends in Epidemiology of Hepatitis B Virus Infection. *J. Clin. Transl. Hepatol.*, 2017, vol. 5, no. 3, pp. 272–276. doi: 10.14218/JCTH.2017.00010
33. Trang N.H., That B.T.T., Thanh T.T.T., Chau L.N., Thanh T.T., Ngoc N.M., Hung N.M., Chau N.V.V., Rahman M. Molecular characteristics of hepatitis B virus (HBV) isolated from chronic hepatitis B patients in South Vietnam. *Virus Evol.*, 2017, vol. 3, suppl. 1: vew036.016. doi: 10.1093/ve/vew036.016

34. Truong B.X., Seo Y., Yano Y., Ho P.T., Phuong T.M., Long D.V., Son N.T., Long N.C., Kato H., Hayashi Y., Trach N.K., Kasuga M. Genotype and variations in core promoter and pre-core regions are related to progression of disease in HBV-infected patients from Northern Vietnam. *Int. J. Mol. Med.*, 2007, vol. 19, no. 2, pp. 293–299. doi: 10.3892/ijmm.19.2.293
35. Vaezjalali M., Rashidpour S., Rezaee H., Hajibeigi B., Zeidi M., Gachkar L., Aghamohamad S., Najafi R., Goudarzi H. Hepatitis B viral DNA among HBs antigen negative healthy blood donors. *Hepat. Mon.*, 2013, vol. 13: e6590. doi: 10.5812/hepatmon.6590
36. Washizaki A., Murayama A., Murata M., Kiyohara T., Yato K., Yamada N., Aly H.H., Tanaka T., Moriishi K., Nishitsuji H., Shimotohno K., Goh Y., Ishii K.J., Yotsuyanagi H., Muramatsu M., Ishii K., Takahashi Y., Suzuki R., Akari H., Kato T. Neutralization of hepatitis B virus with vaccine-escape mutations by hepatitis B vaccine with large-HBs antigen. *Nat. Commun.*, 2022, vol. 13, no. 1: 5207. doi: 10.1038/s41467-022-32910-z.
37. World Health Organization. Hepatitis B. Key facts. URL: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> (08.02.2024)
38. World Health Organization. Regional strategic framework for vaccine-preventable diseases and immunization in the Western Pacific 2021–2030. 2022. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789290619697> (15.01.2024)

Авторы:

Останкова Ю.В., к.б.н., зав. лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Хуинх Х.К.Т., научный сотрудник лаборатории медицинских анализов Института имени Пастера в г. Хошимин, г. Хошимин, Вьетнам;

Серикова Е.Н., научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Щемелев А.Н., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Рейнгардт Д.Э., врач клинической лабораторной диагностики отделения ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Давыденко В.С., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, аспирант ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

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

Authors:

Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of immunology and Virology HIV Infection, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Huynh H.K.T., Researcher, Medical Analysis Laboratory Department, Ho Chi Minh Pasteur Institute, Ho Chi Minh City, Vietnam;

Serikova E.N., Researcher, Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Schemelev A.N., Junior Researcher, Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Reingardt D.E., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostic, Department of Diagnostics of HIV Infection and AIDS-related Diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Davydenko V.S., Junior Researcher, Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, PhD Student, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

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

ПОТЕРЯННЫЕ ГОДЫ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЖИЗНИ, СВЯЗАННЫЕ С ГЕПАТИТОМ В ПРИ НАЛИЧИИ ИЛИ ОТСУТСТВИИ ДЕЛЬТА АГЕНТА, В КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

К.А. Ногойбаева^{1,2}, С.Т. Тобокалова², Э.К. Боронбаева¹

¹ Кыргызская государственная медицинская академия им. И.К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызская Республика

² Кыргызский государственный медицинский институт переподготовки и повышения квалификации им. С.Б. Даниярова, Бишкек, Кыргызская Республика

Резюме. Исследования последних лет указывают, что среди больных хроническим вирусным гепатитом В значительную долю составляют лица с коинфекцией вирусом гепатита D, который, как известно, ускоряет прогрессирование заболевания печени и способствует неблагоприятному исходу болезни. Данные по преждевременной смертности, определяемые на основании индикатора «Потерянные годы потенциальной жизни» (ПГПЖ), позволяют наиболее точно оценить социальное бремя такой коинфекции, что может способствовать усилению мер борьбы с вирусными гепатитами. Целью исследования было проведение сравнительного анализа ПГПЖ от острого и хронического гепатита В без и с дельта агентом в Кыргызской Республике за 2014–2018 гг. **Материалы и методы.** ПГПЖ высчитаны с использованием 145 зарегистрированных летальных случаев от ВГВ в отчетную форму Национального статистического комитета «С51-Распределение умерших по полу, возрастным группам и причинам смерти» за 2014–2018 гг. **Результаты.** В КР за 2014–2018 гг. были зарегистрированы 145 случаев смерти больных с вирусным гепатитом В без (ГВ) и с дельта агентом (ГД). Из них 66% (96/145) пациентов умерли от ГВ, из которых у третьей части (32/96) была установлено острое течение. Среди умерших от гепатита D (19/49), острая форма была зарегистрирована у 39%. ПГПЖ 145 умерших больных в целом составили 3766 лет, из них 63% (2365 лет) были за счет ГВ. Несмотря на то, что от острых форм указанных гепатитов умерли всего 35% больных (51/145), их ПГПЖ составили 52% (1968) от всех недожитых лет и в динамике за 2014–2018 гг. снизились в 4,5 раза от ОГВ (6,3‰ и 1,41‰, 2014 г. и 2018 г. соответственно) и увеличились в 1,1 раза — от ОГД (2,7‰ и 3,1‰, 2014 г. и 2018 г. соответственно). От ХГВ было потеряно в 1,6 раза больше ПГПЖ по сравнению с ХГД (1108 и 691, соответственно). При этом в динамике ПГПЖ от ХГВ выросли в 2,6 раза, а от ХГД — в 6,3 раза. **Заключение.** Высокий уровень ПГПЖ от ГВ и ГД, связанный с вовлечением в процесс детей, свидетельствует о тяжелом бремени указанных заболеваний для Кыргызской Республики. Полученные результаты доказывают, что требуется повышение уровня приверженности взрослого населения к вакцинации против ГВ и обследованию детей в очаге инфекции, независимо от прививочного анамнеза. Резкий рост ПГПЖ от хронических форм гепатитов требует усиления мер вторичной профилактики и обеспечения своевременного доступа к специализированной помощи лиц из очагов инфекции. Также имеется необходимость проведения оценки системы эпидемиологического надзора за вирусными гепатитами с летальным исходом.

Ключевые слова: социальное бремя, ПГПЖ, гепатит В, гепатит D, смертность, летальность, Кыргызская Республика.

Адрес для переписки:

Ногойбаева Калысбубу Асанбековна
720000, Кыргызская Республика, Бишкек, ул. И. Ахунбаева, 92,
Кыргызская государственная медицинская академия
им. И.К. Ахунбаева.
Тел.: +996 (312) 65-26-48; +996 (550) 63-58-64.
E-mail: k.nogoibaeva2014@gmail.com

Contacts:

Kalys A. Nogoibaeva
720000, Kyrgyz Republic, Bishkek, I. Akhunbaeva str., 92,
I.K. Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy.
Phone: +996 (312) 65-26-48; +996 (550) 63-58-64.
E-mail: k.nogoibaeva2014@gmail.com

Для цитирования:

Ногойбаева К.А., Тобокалова С.Т., Боронбаева Э.К. Потерянные годы потенциальной жизни, связанные с гепатитом В при наличии или отсутствии дельта агента, в Кыргызской Республике // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 331–338. doi: 10.15789/2220-7619-YOP-2129

Citation:

Nogoibaeva K.A., Tobokalova S.T., Boronbaeva E.K. Years of potential life lost due to hepatitis B with or without Delta agent in the Kyrgyz Republic // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 331–338. doi: 10.15789/2220-7619-YOP-2129

YEARS OF POTENTIAL LIFE LOST DUE TO HEPATITIS B WITH OR WITHOUT DELTA AGENT IN THE KYRGYZ REPUBLIC

Nогойбаева К.А.^{a,b}, Тобокалова С.Т.^b, Боронбаева Е.К.^a

^a I.K. Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy, Bishkek, Kyrgyz Republic

^b Kyrgyz State Medical Institute of Retraining and Advanced Training named after S.B. Daniyarov, Bishkek, Kyrgyz Republic

Abstract. Recent studies indicate that a marked percentage of chronic viral hepatitis B patients is coinfecting with hepatitis D virus known to accelerate the progression of liver disease and contribute to unfavourable disease outcome. Data on premature mortality assessed by the Lost Years of Potential Life (LYPL) indicator, provide the most accurate social burden estimate for such coinfection able to contribute to strengthening viral hepatitis control measures. The aim of the study was to conducting comparative LYPL analyses due to acute and chronic hepatitis B infection without and with delta agent in the Kyrgyz Republic in the years 2014–2018. *Materials and methods.* LYPL magnitude was calculated using the number of recorded deaths in the reporting form of the 2014–2018 National Statistics Committee «C51-Distribution of deaths by sex, age groups and causes of death». *Results.* In 2014–2018, 145 cases of death of patients with viral hepatitis B without (HB) and with a delta agent (D) were registered in the Kyrgyz Republic. Of these, 66% (96/145) of patients died from hepatitis B, of which a third (32/96) had an acute disease course. And among those who died from hepatitis D (19/49), acute course was registered in 39%. LYPL for the 145 deceased patients totaled 3766 years, of which 63% (2365 years) were due to HB. Despite that only 35% of patients (51/145) died from acute forms of such hepatitides, their LYPL accounted for 52% (1968) of total years lost that decreased by 4.5-fold for 2014–2018 due to AHB (6.3‰ and 1.41‰, 2014 and 2018, respectively) but increased by 1.1-fold due to AHD (2.7‰ and 3.1‰, 2014 and 2018, respectively). Chronic hepatitis B vs CHD resulted in 1.6 times higher LYPL magnitude (1108 and 691, respectively). At the same time, LYPL due to CHB dynamically increased by 2.6 times, whereas due to CHD — by 6.3 times. *Conclusion.* The high LYPL level due to hepatitis B and D infection related to pediatric cases evidence about a heavy burden of such diseases in the Kyrgyz Republic. The data obtained prove that it is necessary to increase adherence of adult population to hepatitis B vaccination and examine children at the site of infection, regardless of vaccination history. Abruptly increased LYPL due to chronic hepatitis cases requires strengthening secondary prevention measures and ensuring timely access to specialized care at infection sites. It is also necessary to evaluate epidemiological surveillance after fatal viral hepatitis.

Key words: social burden, LYPL, hepatitis B virus (HBV), hepatitis D virus (HDV), Kyrgyz Republic.

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в мире с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (ВГВ) живут 296 млн человек, 820 тыс. умерли в результате цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы в его исходе [28]. Исследования последних лет указывают, что 33–47% ВГВ-инфицированных лиц имеют антитела против вируса гепатита D (ВГD), что оценивается примерно в 120–160 млн больных [14, 15, 24]. Отсутствие высокоэффективных этиотропных препаратов против ВГВ и ВГD не позволяет достичь полной элиминации возбудителей из организма [16, 27].

Для определения приоритетности проблем общественного здравоохранения современная медицина ориентируется не только на число заболевших и/или умерших больных. Данные по преждевременной смертности, определяемые на основании индикатора «Потерянные годы потенциальной жизни» (ППГЖ), разработанного Всемирным банком совместно с ВОЗ в 1993 г., позволяют наиболее точно оценить социальное бремя заболевания [2]. Применяя данные по количеству случаев с летальным исходом, и возрасту каждого умершего пациента на момент смерти, исследователи многих стран оценивают ППГЖ от вирусного гепатита [17, 21, 25].

Также, как и во всем мире, в Центрально-Азиатских странах парентеральные вирусные гепатиты являются одной из актуальных проблем [18, 19, 20, 23, 26]. В Кыргызской Республике (КР) рядом отечественных исследователей изучены эпидемиологические параметры, клинико-лабораторные особенности течения острой формы гепатита В без и с дельта агентом у детей и взрослых [1, 4, 5, 6, 12, 13]. Проведенное нами ранее исследование, посвященное молекулярно-генетическому анализу полных геномов ВГВ и ВГD, позволило определить циркулирующие на территории страны генотипы вирусов, а также выявить штаммы ВГВ, несущие мутации, связанные с ранним развитием цирроза и рака печени [7, 8].

Исследователи нашей страны оценили ППГЖ от ВИЧ инфекции при монотечении и ко-инфекции с гепатитом В и С. Определили, что самый высокий показатель недожитых лет был отмечен у лиц с коинфекцией ВИЧ/ВГВ (33 года), ВИЧ-инфицированных без ВГ — 30,7 лет, показатель у коинфицированных ВИЧ/ВГС был самым низким (26,1 лет) [11]. Таким образом, ко-инфекция с ВГВ давала максимальные показатели недожитых лет, что вызвало у нас интерес к изучению индикатора ППГЖ от самого ВГВ без дельта агента и с дельта агентом. Оценка социальной значимости коинфек-

ции в Кыргызской Республике путем сравнительного анализа ПГПЖ несомненно будет способствовать снижению бремени болезни в стране путем усиления мер борьбы с вирусными гепатитами.

Целью данного исследования явилось проведение сравнительного анализа ПГПЖ от острого и хронического гепатита В без и с дельта агентом в КР за 2014–2018 гг.

Материалы и методы

С целью определения социального бремени были высчитаны потерянные годы потенциальной жизни (ПГПЖ) на основании данных 145 летальных случаев от вирусного гепатита В без и с дельта агентом. От гепатита В умерли 66% (96/145) пациентов, у третьей части которых (32/96) была установлена острая форма болезни. Число умерших от гепатита D было в 2 раза меньше, чем от ГВ (49/145), острая форма была зарегистрирована у 39% из них. В целом, от острой формы ГВ и ГД умер каждый третий пациент (51/145), соответственно у 65% (94/145) пациентов в качестве причины смерти указана хроническая форма вирусного гепатита.

Число умерших больных было взято из отчетной формы Национального статистического комитета (НСК) «С51-Распределение умерших по полу, возрастным группам и причинам смерти» за 2014–2018 гг. [9]. Из расчета были исключены лица, имеющие возраст выше «ожидаемой продолжительности жизни». Последний ежегодно определяется Республиканским центром электронного здравоохранения Министерства здравоохранения КР.

Расчет ПГПЖ был проведен с использованием формулы:

$$\text{ПГПЖ} = \sum D_i \times a_i,$$

где D_i — абсолютное число умерших в возрастном интервале i ; a_i — недожитые годы.

В свою очередь, для расчета недожитых лет (a_i) использована формула:

$$a_i = T - x_i,$$

где T — верхний предельный возраст, до которого рассчитываются недожитые годы; x_i — середина соответствующего возрастного интервала, которая рассчитана по формуле; $x_i = (\text{минимальный возраст} + \text{максимальный возраст в данной возрастной группе} + 1)/2$.

Для анализа относительных показателей был использован коэффициент ПГПЖ (ПГПЖ_к) на 100 000 населения, который был рассчитан по формуле:

$$\text{ПГПЖ}_k = \text{ПГПЖ}/P_u \times 100\,000,$$

где P_u — численность изучаемого населения в возрасте от 1 года и до «Т» [3].

Обработка материала была проведена с использованием статистического пакета копиятерной программы Microsoft Office Excel.

Результаты

Потерянные годы потенциальной жизни 145 умерших больных в целом составили ≈ 3766 лет (рис. 1, рис. 2). Смерть 96 пациентов с ГВ привела к потере ≈ 2365 лет потенциальной жизни и составила 63% от общих потерянных лет (≈ 3765), а от ГД было потеряно в 1,7 раз меньше (1400) потенциальных лет жизни. Несмотря на то, что от острых форм указанных гепатитов умерли всего 35% (51/145) больных, потерянные годы потенциальной жизни (ПГПЖ) составили 52% (1968) из всех недожитых лет.

Расчет ПГПЖ на один летальный случай показал, что в среднем каждый умерший пациент с ГД потерял 28,6 лет, а при ГВ указанный показатель был меньше на 4 года и составил в среднем 24,6 года. Детальный анализ свидетельствует, что хотя 64% времени жизни (1258 лет) были недожиты из-за ОГВ, средние показатели ПГПЖ на один случай ОГД и ОГВ были почти одинаковыми и составили 37,4 и 39,3 лет, соответственно (средний ПГПЖ при ОГ — 38,5 лет).

На стадии хронического гепатита умерли $\frac{2}{3}$ (65%, 94/145) пациентов, при этом было недожито примерно на 200 лет меньше, чем при острых формах. На один случай хронической формы гепатита показатель ПГПЖ в среднем составил 19,2 года, при этом средний показатель недожитых лет был выше при ХГД, чем при ХГВ на 5,7 лет (23,0 и 17,3 лет соответственно).

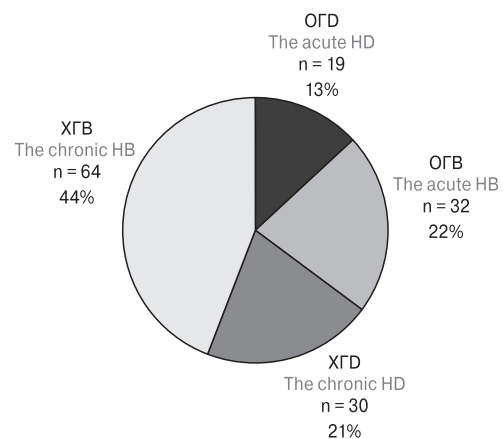


Рисунок 1. Распределение летальных случаев с острым и хроническим гепатитом В без (ОГВ и ХГВ) и с дельта агентом (ОГД и ХГД), n = 145, Кыргызская Республика, 2014–2018 гг., Национальный статистический комитет

Figure 1. 2014–2018 Distribution of lethal cases due to acute and chronic hepatitis B without (HB) and with delta agent (HD), n = 145, Kyrgyz Republic, National Statistical Committee

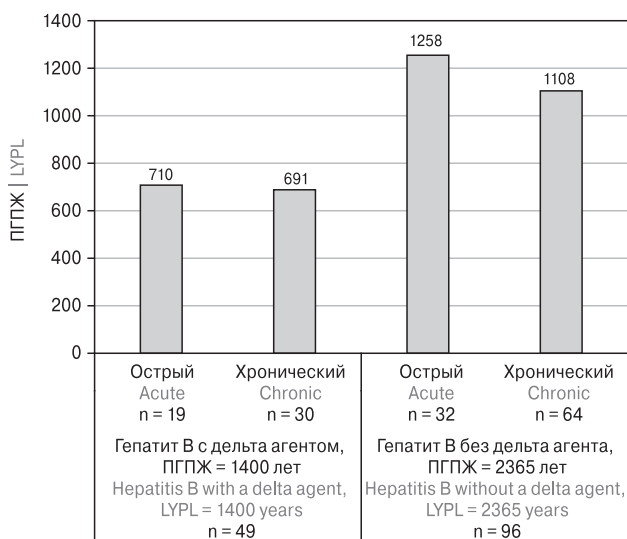


Рисунок 2. Сравнительные данные по потерянному году потенциальной жизни (ПГПЖ) от острого и хронического гепатита В без и с дельта агентом, Кыргызская Республика, 2014–2018 гг.

Figure 2. Comparative data of the 2014–2018 Lost Years of Potential Life (LYPL) due to acute and chronic hepatitis B without and with the delta agent, Kyrgyz Republic

Сравнительные данные ПГПЖ от острой формы ГВ и ГД в динамике за 2014–2018 гг., представленные в табл. 1 показывают, что за пять лет количество потерянных лет жизни снизилось в 1,9 раза (519 и 280 в 2014 г. и 2018г. соответственно). При этом, ПГПЖ от ОГВ сни-

зились в 4,1 раза (366 и 89 в 2014 г. и 2018 г. соответственно), а от ОГД возросли в 1,2 раза (154 и 192 в 2014 г. и 2018 г. соответственно).

Коэффициент ПГПЖ, рассчитанный на 100 000 населения, также доказывает, что в стране отмечается снижение в 4,5 раза недожитых лет жизни от ОГВ (6,3‰ и 1,41‰ в 2014 г. и 2018 г. соответственно) и увеличение в 1,1 раза — от ОГД (2,7‰ и 3,1‰, 2014 г. и 2018 г. соответственно). При этом, средний коэффициент потери от последнего, за четыре анализируемых года меньше в 1,8 раз, по сравнению с ОГВ (4,2‰ и 2,4‰ в ОГВ и ОГД соответственно).

Как видно из табл. 2 за 2014–2018 гг. при ХГВ было потеряно в 1,6 раза больше ПГПЖ по сравнению с ХГД (1108 и 691 соответственно), что подтверждается соотношением коэффициентов ПГПЖ (3,7‰ и 2,3‰ в ХГВ и ХГД соответственно). Вместе с тем ПГПЖ от ХГВ выросли в 2,6 раза (147 и 375 в 2014 г. и 2018 г. соответственно), а от ХГД — в 6,3 раза (27 и 169 в 2014 г. и 2018 г. соответственно). Коэффициент ПГПЖ, рассчитанный на 100 000 населения, показывает рост недожитого времени жизни в 2,4 раза при ХГВ (2,5‰ и 6,0‰ в 2014 г. и 2018 г. соответственно) и в 5,4 раза при ХГД (0,5‰ и 2,7‰, 2014 г. и 2018 г. соответственно).

ПГПЖ от ОГВ по сравнению с ХГВ (1258 и 1108 соответственно) и коэффициент ПГПЖ (4,2‰ и 3,7‰ в 2014 г. и 2018 г. соответственно) возросли в 1,1 раза. Эти показатели при ОГД и ХГД (710 и 691 в 2014 г. и 2018 г. соответственно) почти не отличались.

Таблица 1. Динамика показателя оценки потери здоровья от острого гепатита В без и с дельта агентом, Кыргызская Республика, 2014–2018 гг.

Table 1. Dynamically assessed 2014–2018 loss of health level due to acute hepatitis B without and with a delta agent, the Kyrgyz Republic

Годы Years	2014	2015	2016	2017	2018	2014–2018	
Потерянные годы потенциальной жизни (ПГПЖ) The Lost Years of Potential Life (LYPL)							
1	Острый гепатит D, n = 19 The acute HD, n = 19	153,6	120,8	160,6	83,2	191,5	709,7
2	Острый гепатит В, n = 32 The acute HB, n = 32	365,6	246,6	248,4	308,7	88,6	1257,9
Всего, n = 51 Total, n = 51		519,2	367,4	409	391,9	280,1	1967,6
Коэффициент ПГПЖ на 100 000 населения LYPL ratio per 100 000 population							
1	Острый гепатит D, n = 19 The acute HD, n = 19	2,7	2,0	2,7	1,4	3,1	2,4
2	Острый гепатит В, n = 32 The acute HB, n = 32	6,3	4,2	4,1	5,0	1,4	4,2
Ожидаемая продолжительность жизни* Life expectancy*		70,4	70,6	70,9	71,1	71,3	

Таблица 2. Динамика показателя оценки потери здоровья от хронического гепатита В без и с дельта агентом, 2014–2018 гг., Кыргызстан

Table 2. Dynamically assessed 2014–2018 loss of health level due to chronic hepatitis B without and with a delta agent, the Kyrgyz Republic

Годы Years		2014	2015	2016	2017	2018	2014–2018
Потерянные годы потенциальной жизни The Lost Years of Potential Life (LYPL)							
1	Хронический гепатит D, n = 30 The chronic HD, n = 30	26,8	90,8	162,3	241,9	168,7	690,5
2	Хронический гепатит В, n = 64 The chronic HB, n = 64	147	54,4	125	407	375	1108,4
Всего, n = 94 Total, n = 94		173,8	145,2	287,3	648,9	543,7	1798,9
Коэффициент ПГПЖ на 100 000 населения LYPL ratio per 100, 000 population							
1	Хронический гепатит D, n = 30 The chronic HD, n = 30	0,5	1,5	2,7	3,9	2,7	2,3
2	Хронический гепатит В, n = 64 The chronic HB, n = 64	2,5	0,9	2,1	6,6	6,0	3,7
Продолжительность жизни* Life expectancy*		70,4	70,6	70,9	71,1	71,3	

Примечание. *По данным Республиканского центра электронного здравоохранения Министерства здравоохранения.

Note. *According to the Republican eHealth Center of the Ministry of Health.

Обсуждение

В нашей стране за анализируемый период (за 2014–2018 гг.) от ГВ было потеряно в 1,7 раз больше лет потенциальной жизни, чем от ГД (2365 лет и 1400 лет соответственно), данный факт связан с большим числом умерших пациентов от ГВ (96 и 49 от ГВ и ГД соответственно). ПГПЖ от ГД больше на 4 года, чем от ГВ (28,6 и 24,6 соответственно), что вероятно связано с более тяжелым течением гепатита дельта и склонностью к быстрому развитию цирроза и рака печени [10]. Исследователи показали, что ПГПЖ от цирроза печени в Бразилии составили 138860 лет за один год (1989 г.), то есть, каждый пациент в среднем недожил 15,5 лет [21]. Соответственно в нашей стране от ВГ пациенты теряют потенциальные годы жизни в 1,6 и 1,8 раза больше, чем в указанной стране (ГВ и ГД соответственно). В то же время общие потерянные годы в Бразилии были выше, чем в КР, в 36,6 раза, что вероятно связано с большим числом летальных случаев, каждый из которых не доживал 15,5 лет потенциальных годов жизни.

Саттарова Г.Ж. с соавт. в одном из исследований показали, что в КР высокий показатель ПГПЖ был отмечен у лиц с коинфекцией ВИЧ/ВГВ (33 года) [11]. Наши данные свидетельствуют, что пациенты с ВГВ без дельта агента и без ВИЧ инфекции живут дольше на 8,4 года, чем больные ВИЧ/ВГВ (24,6 и 33 соответственно). А пациенты с ГД живут на 4,4 года дольше, чем

лица живущие с ВИЧ-инфекцией и ГВ (28,6 и 33 соответственно). Полученные результаты показывают, что в КР при сочетании ВГВ с ВИЧ потерянных лет потенциальной жизни больше, чем при монотечении указанных гемоконтактных инфекций.

Превалирование числа умерших пациентов с острым гепатитом, у которых этиологическим фактором признан ВГВ (63%, 32/51), вероятно связано с тем, что детектируемый уровень антител к ВГД обычно определяется на 2–3 неделе желтушного периода [10], и если среди указанных случаев и были пациенты с наличием дельта агента, им был выставлен диагноз «ОГВ без дельта агента». Подобную ситуацию показал в своем исследовании Negresku G.V. еще в 1992 г., когда при детальном обследовании пациентов с верифицированным диагнозом «острый гепатит В» у 30% был выявлен ВГД [22]. Наши пациенты с острой формой гепатита потеряли больше лет потенциальной жизни (39,3 лет и 37,4 лет при ОГВ и ОГД соответственно), нежели больные с хронической формой (17,3 лет 23,0 лет при ХГВ и ХГД соответственно), это свидетельствует о том, что пациенты с острым гепатитом умерли в более молодом возрасте.

В динамике за анализируемые пять лет (2014–2018 гг.) ПГПЖ от ОГВ снизились в 4,1 раза, что, вероятно, связано с уменьшением числа умерших больных с ВГВ-инфекцией (6,3‰ и 1,4‰ в 2014 г. и 2018 г. соответственно). Обращает на себя внимание то, что в динамике от ОГД количество недожитых лет вырос-

ло в 1,2 раза, что было связано с умеренным увеличением числа умерших больных (2,7‰ и 3,1‰ в 2014 г. и 2018 г. соответственно) и смертью ребенка 7 лет, рожденного от матери с HBsAg позитивным статусом. Снижение указанного индикатора при ОГВ и рост при ОГД, также объясняется улучшением этиологической расшифровки и идентификации дельта агента у умерших больных в остром периоде. В некоторых странах отмечается снижение смертности и потенциально потерянных лет жизни от ВГВ и ВГС, например, в Португалии наблюдалось значительное снижение потерянных лет жизни с 2010 по 2017 г. (13 647 и 8848 соответственно), что может быть результатом успешной реализации программ контроля вирусных гепатитов [25].

В динамике ПППЖ за период 2014–2018 гг. от хронических форм гепатитов выросли, в частности от ГД — в 2,4 раза больше, чем от ГВ, что указывает на более выраженное бремя дельта гепатита, в связи с тяжелым течением и частотой неблагоприятного исхода, а также с наличием летальности среди детей.

Факт регистрации «хронической» формы у 65% анализируемых летальных случаев с HBsAg позитивным гепатитом требует уточнения, так как общеизвестно, что причиной смерти при вирусных гепатитах является массивный и субмассивный цитолиз гепатоцитов, приводящий к энцефалопатии, вследствие печеночной недостаточности при остром течении болезни. Кроме того, причиной смерти могут быть пищеводные кровотечения в продвину-

тых стадиях гепатита из-за портальной гипертензии [9]. Соответственно, хроническая форма парентеральных гепатитов без осложнений редко может приводить к смерти. В связи с чем, необходимо разработать критерии стандартного определения случая «хронического» гепатита при регистрации, как причины смерти, в отчетную форму НСК «С51-Распределение умерших по полу, возрастным группам и причинам смерти» в Кыргызской Республике.

Выводы

Высокий уровень ПППЖ от ГВ и ГД, связанный с вовлечением в процесс детей, указывает на наличие тяжелого бремени указанных заболеваний для Кыргызской Республики. Полученные результаты доказывают, что требуется повышение уровня приверженности взрослого населения к вакцинации против гепатита В и обследованию детей в очаге инфекции, независимо от прививочного анамнеза. Резкий рост ПППЖ от хронических форм гепатитов требует усиления мер вторичной профилактики и обеспечения своевременного доступа к специализированной помощи лиц из очагов инфекции. Также имеется необходимость проведения оценки системы эпидемиологического надзора за вирусными гепатитами с летальным исходом.

Конфликт интересов

Не имеем финансовой заинтересованности и иных выгод от публикации данной статьи.

Список литературы/References

1. Анарбаева Ж.А., Суранбаева Г.С., Ташполотова А.Ш., Мурзакулова А.Б., Максытов С.Б. Клинические и эпидемиологические особенности хронического вирусного гепатита дельта в Кыргызской Республике // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 6. [Anarbaeva Zh.A., Suranbaeva G.S., Tashpolotova A.Sh., Murzakulova A.B., Maksytov S.B. Clinical and epidemiological features of chronic delta viral hepatitis in the Kyrgyz Republic. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2016, no. 6. (In Russ.)] URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25748>
2. Вдовенко С.А., Кведер Л.В., Буклешева М.С., Гермизина А.А., Мальшин Ю.А., Диков Ю.Ю., Лукашевич О.В., Письменный А.К., Кочкарев А.В., Сорокин С.Г., Ашепков В.В., Блынский Д.В., Сергеев О.В. Оценка преждевременной смертности населения городского округа Чапаевск для обоснования приоритетных проблем здоровья населения с использованием индикатора «потерянные годы потенциальной жизни – 65» // Управление качеством медицинской помощи. 2017. № 1–2. С. 6–15. [Vdovenko S.A., Kveder L.V., Buklesheva M.S., Germizina A.A., Malshin Yu.A., Dikov Yu.Yu., Lukashevich O.V., Pismenny A.K., Kochkarev A.V., Sorokin S.G., Ashchepkov V.V., Blynsky D.V., Sergeev O.V. Estimation of premature mortality of the population of the urban district of Chapaevsk to substantiate the priority problems of public health using the indicator “lost years of potential life – 65”. *Upravlenie kachestvom meditsinskoj pomoshchi = Management of the Quality of Medical Care*, 2017, no. 1–2, pp. 6–15. (In Russ.)]
3. Красильников И.А., Иванов А.Е., Семенова В.Г., Сабгайда Т.П., Евдокушкина Г.Н. Методические рекомендации по использованию показателя «потерянные годы потенциальной жизни» (ПППЖ) для обоснования приоритетных проблем здоровья населения России на федеральном, региональном и муниципальном уровнях. М., 2014. 32 с. [Krasilnikov I.A., Ivanov A.E., Semenova V.G., Sabgaida T.P., Evdokushkina G.N. Methodological recommendations on the use of the indicator “years of potential life lost” (PYLL) to substantiate the priority health problems of the Russian population at the federal, regional and municipal levels. *Moscow*, 2014. 32 p. (In Russ.)]
4. Ногойбаева К.А., Касымбекова К.Т., Тобокалова С.Т., Мурзаева А.Т. Заболеваемость детей хроническими вирусными гепатитами В и D, 2010–2013 гг., Кыргызстан // Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева. 2015. № 4. С. 139–141. [Morbidity of children with chronic viral hepatitis B and D, 2010–2013, Kyrgyzstan. *Vestnik KGMA im. I.K. Akhunbaeva = Bulletin of KSMA im. I.K. Akhunbaeva*, 2015, no. 4, pp. 139–141. (In Russ.)]

5. Ногойбаева К.А., Тобокалова С. Т. Этиологическая и эпидемиологическая характеристика летальности от острого вирусного гепатита в Кыргызстане, 2009–2018 гг. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2020. № 1. С. 40–46. Nogoibaeva K.A., Tobokalova S.T. Etiological and epidemiological characteristics of mortality from acute viral hepatitis in Kyrgyzstan, 2009–2018. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2020, no. 1. pp. 40–46. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-1-40-46
6. Ногойбаева К.А., Тобокалова С.Т., Бекенова Д.С., Назарбаева Ж.Н. Хронический гепатит В без и с дельта агентом в Кыргызстане (эпидемиологическая ситуация, клинические особенности) // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 577–582. [Nogoibaeva K.A., Tobokalova S.T., Bekenova D.S., Nazarbaeva J.N. Chronic hepatitis B associated without/with a delta agent in Kyrgyzstan (epidemiological situation, clinical features). *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet*, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 577–582. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-577-582
7. Останкова Ю.В., Ногойбаева К.А., Зуева Е.Б., Касымбекова К.Т., Тобокалова С.Т., Семенов А.В. Филогенетический анализ и характеристика полноразмерных последовательностей генома вируса гепатита дельта, выделенных у больных хроническим вирусным гепатитом В/Д в Кыргызской Республике // Проблемы особо опасных инфекций. 2020. № 1. С. 124–132. [Ostankova Yu.V., Nogoibaeva K.A., Zueva E.B., Kasymbekova K.T., Tobokalova S.T., Semenov A.V. Characterization of the full-length genome sequences and phylogenetic analysis of HDV strains isolated from patients with chronic HBV and HDV infection in Kyrgyz Republic. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2020, no. 1, pp. 124–132. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2020-1-124-132
8. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.Б., Ногойбаева К.А., Касымбекова К.Т., Тобокалова С.Т., Тотолян Арег А. Распространенность клинически значимых мутаций вируса у больных хроническим вирусным гепатитом В // Клиническая лабораторная диагностика. 2020. Т. 65, № 1. С. 61–66. [Ostankova Yu.V., Semyonov A.V., Zueva E.B., Nogoibaeva K.A., Kasymbekova K.T., Tobokalova S.T., Totolian Areg A. Prevalence of clinically significant virus mutations in patients with chronic viral hepatitis B. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2020, vol. 65, no. 1, pp. 61–66. (In Russ.)] doi: 10.18821/0869-2084-2020-65-1-61-66
9. Отчет о распределении умерших по полу, возрастным группам и причинам смерти: отчетная форма С51. Национальный статистический комитет КР. [Report on the distribution of the dead by sex, age groups and causes of death: reporting form С51. National Statistical Committee of the Kyrgyz Republic. (In Russ.)]
10. Ройтберг Г.Е., Струтынский А.В. Внутренние болезни. Печень, желчевыводящие пути, поджелудочная железа // М.: МЕДпресс-информ, 2013. 632 с. [Roitberg G.E., Strutynsky A.V. Internal illnesses. Liver, biliary tract, pancreas. *Moscow: MEDpress-inform*, 2013. 632 p. (In Russ.)]
11. Саттарова Г.Ж., Нурматов З.Ш., Суранбаева Г.С. Анализ смертности от ко-инфекции ВИЧ и вирусных гепатитов В и С в Кыргызской Республике // Здравоохранение Кыргызстана. 2023. № 1. С. 115–120. [Sattarova G. Zh., Nurmatov Z. Sh., Suranbayeva G. S. Analysis of mortality from co-infection with HIV and viral hepatitis B and C in the Kyrgyz Republic. *Zdravookhranenie Kyrgyzstana = Healthcare of Kyrgyzstan*, 2023, no. 1, pp. 115–120. (In Russ.)] doi: 10.51350/zdravkg2023.1.2.16.115.120
12. Семенов А.В., Останкова Ю.В., Ногойбаева К.А., Касымбекова К.Т., Лаврентьева И.Н., Тобокалова С.Т., Тотолян Арег А. Особенности молекулярной эпидемиологии сочетанной инфекции ВГВ/ВГД в Кыргызстане // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 2. С. 141–150. [Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Nogoibaeva K.A., Kasymbekova K.T., Lavrenteva I.N., Tobokalova S.T., Totolian Areg A. Molecular epidemiology features of HBV/HDV co-infection in Kyrgyzstan. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016. vol. 6, no. 2, pp. 141–150. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2016-2-141-150
13. Тобокалова С.Т. Применение реаферона при острых гепатитах В и D у детей с железодефицитной анемией // Детские инфекции. 2004. № 3. С. 46–48. [Tobokalova S.T. The use of reaferon in acute hepatitis B and D in children with iron deficiency anemia. *Detskie infektsii = Children Infections*, 2004, no. 3, pp. 46–48. (In Russ.)]
14. Botelho-Souza L.F., Vasconcelos M.P.A., Dos Santos A.O., Salcedo J.M.V., Vieira D.S. Hepatitis delta: virological and clinical aspects. *Virolog. J.*, 2017, vol. 14, no. 1: 177. doi: 10.1186/s12985-017-0845-y
15. Delfino C.M., Cerrudo C.S., Biglione M., Oubiña J.R., Ghiringhelli P.D., Mathet V.L. A comprehensive bioinformatic analysis of hepatitis D virus full-length genomes. *J. Viral. Hepat.*, 2018, vol. 25, no. 7, pp. 860–869. doi: 10.1111/jvh.12876
16. Elazar M., Glenn J.S. Emerging concepts for the treatment of hepatitis delta. *Curr. Opin. Virol.*, 2017, vol. 24, pp. 55–59. doi: 10.1016/j.coviro.2017.04.004
17. García-Fulgueiras A., García-Pina R., Morant C., García-Ortuzar V., Génova R., Alvarez E. Hepatitis C and hepatitis B-related mortality in Spain. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2009, vol. 21, no. 8, pp. 895–901. doi: 10.1097/MEG.0b013e328313139d
18. Jumabayeva A., Nersesov A., Kulzhanov M., Nefedova M., Nuraliyeva G., Rakhimbekova G., Tanabayeva S., Fakhradiyev I. Prevalence of Viral Hepatitis B, C, and D in Kazakhstan. *Scientific World Journal*, 2022, no. 2022: 9102565. doi: 10.1155/2022/9102565
19. Khan A., Kurbanov F., Tanaka Y., Elkady A., Sugiyama M., Dustov A., Mizokami M. Epidemiological and clinical evaluation of hepatitis B, hepatitis C, and delta hepatitis viruses in Tajikistan. *J. Med. Virol.*, 2008, vol. 80, no. 2, pp. 268–276. doi: 10.1002/jmv.21057
20. Khodjaeva M., Ibadullaeva N., Khikmatullaeva A., Joldasova E., Ismoilov U., Colombo M., Caviglia G.P., Rizzetto M., Musabaev E. The medical impact of hepatitis D virus infection in Uzbekistan. *Liver Int.*, 2019, vol. 39, no. 11, pp. 2077–2081. doi: 10.1111/liv.14243
21. Lessa I. Cirrose hepática no Brasil: mortalidade e anos produtivos de vida perdidos precocemente [Liver cirrhosis in Brazil: mortality and productive years of life lost prematurely]. *Bol. Oficina Sanit. Panam.*, 1996, vol. 121, no. 2, pp. 111–122. (In Portuguese)
22. Negresku G.V., Iashina T.L., Burkov A.N., Favorov M.O. Klinika i iskhody ostrogo del'ta-gepatita [The clinical picture and outcome of acute delta infection]. *Klin. Med. (Mosk.)*, 1992, vol. 70, no. 1, pp. 80–84. (In Russ.)
23. Negro F. The heavy burden of hepatitis D in Uzbekistan. *Liver Int.*, 2019, vol. 39, no. 11, pp. 2034–2035. doi: 10.1111/liv.14244

24. Patel E.U., Thio C.L., Boon D., Thomas D.L., Tobian A.A.R. Prevalence of Hepatitis B and Hepatitis D Virus Infections in the United States, 2011–2016. *Clin. Infect. Dis.*, 2019, vol. 69, no. 4, pp. 709–712. doi: 10.1093/cid/ciz001
25. Silva J.M., Silva M.J., Calinas F., Nogueira P.J. Burden of Liver Cirrhosis in Portugal between 2010 and 2017. *GE Port. J. Gastroenterol.*, 2021, vol. 28, no. 3, pp. 153–161. doi: 10.1159/000510729
26. Stockdale A.J., Kreuels B., Henrion M.Y.R., Giorgi E., Kyomuhangi I., de Martel C., Hutin Y., Geretti A.M. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis. *J. Hepatol.*, 2020, vol. 73, no. 3, pp. 523–532. doi: 10.1016/j.jhep.2020.04.008
27. Terrault N.A., Lok A.S.F., McMahon B.J., Chang K.M., Hwang J.P., Jonas M.M., Brown R.S. Jr., Bzowej N.H., Wong J.B. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology*, 2018, vol. 67, no. 4, pp. 1560–1599. doi: 10.1002/hep.29800
28. World Health Organization Fact Sheet. Viral Hepatitis B. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> (10.01.2023)

Авторы:

Ногойбаева К.А., д.м.н., зав. кафедрой менеджмента научных исследований Кыргызской государственной медицинской академии имени И.К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызская Республика; доцент профессорского курса инфекционных болезней Кыргызского государственного медицинского института переподготовки и повышения квалификации имени С.Б. Даниярова, г. Бишкек, Кыргызская Республика;
Тобокалова С.Т., д.м.н., зав. профессорским курсом инфекционных болезней Кыргызского государственного медицинского института переподготовки и повышения квалификации имени С.Б. Даниярова, Бишкек, Кыргызская Республика;
Боронбаева Э.К., к.м.н., и.о. доцента кафедры пропедевтики детских болезней Кыргызской государственной медицинской академии имени И.К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызская Республика.

Authors:

Nogoibaeva K.A., DSc (Medicine), Head of the Department of Scientific Research Management, I.K. Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy, Bishkek, Kyrgyz Republic; Associate Professor of the Professorial Course in Infectious Diseases, Kyrgyz State Medical Institute for Retraining and Advanced Training named after S.B. Daniyarov, Bishkek, Kyrgyz Republic;
Tobokalova S.T., DSc (Medicine), Head of the Professorial Course of Infectious Diseases, Kyrgyz State Medical Institute of Retraining and Advanced Training named after S.B. Daniyarov, Bishkek, Kyrgyz Republic;
Boronbaeva E.K., PhD (Medicine), Acting Associate Professor of the Department of Propaedeutics of Childhood Diseases, I.K. Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy, Bishkek, Kyrgyz Republic.

Поступила в редакцию 17.01.2023
Отправлена на доработку 26.02.2023
Принята к печати 25.05.2024

Received 17.01.2023
Revision received 26.02.2023
Accepted 25.05.2024

ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ВИРУЛЕНТНОСТИ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

А.А. Самойлова¹, Л.А. Краева^{1,2}, Н.В. Михайлов^{1,3}, А.Т. Сaitова¹, Д.Е. Полев¹,
М.А. Вашукова⁴, С.А. Гордеева⁴, Е.В. Смирнова⁵, Л.И. Белятич⁶, А.С. Долгова¹,
А.В. Шабалина¹

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

² ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

⁴ Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге, Санкт-Петербург, Россия

⁶ Городская больница № 14, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В последние годы штаммы *Klebsiella pneumoniae* получили широкое распространение как при внебольничных инфекционных процессах, так и при нозокомиальных инфекциях. Выделяют два патотипа *K. pneumoniae*: классический (сКр) и гипервирулентный (hvКр). Представители любого патотипа склонны к приобретению и дальнейшей передаче генетических факторов антибиотикорезистентности и вирулентности, что может помочь при назначении адекватной терапии. Поскольку не существует универсально согласованного отдельного маркера гипервирулентности, нами предпринята попытка найти наиболее значимые комбинации генетических маркеров вирулентности и антибиотикорезистентности у штаммов *K. pneumoniae*. Цель исследования — выявление наиболее значимых комбинаций генетических маркеров вирулентности и антибиотикорезистентности для характеристики клинических изолятов *K. pneumoniae*. **Материалы и методы.** Исследовали 85 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из проб различного клинического материала от пациентов крупных стационаров Санкт-Петербурга. В работе использовали классические бактериологические методы, в том числе определение гипермукоидного типа с помощью «стринг-теста», масс-спектрометрический метод (MALDI-TOF MS) для идентификации бактерий, молекулярные методы для изучения маркеров вирулентности и антибиотикорезистентности (мультилокусное сиквенс-типирование, секвенирование генома штаммов *K. pneumoniae*). **Результаты.** Среди всех исследованных штаммов *K. pneumoniae* самыми распространенными генами карбапенемаз были гены OXA-48 (18,7%) и NDM-1 — 17,3% штаммов, в 6,7% штаммов гены NDM-1 и OXA-48 присутствовали одновременно. Доля штаммов с генами β-лактамаз CTX-M-15 составила 54,7%, OXA-1 — 17,3%, TEM-1D — 13,3% и в 17,3% случаев в штаммах одновременно присутствовали гены OXA-1 и TEM-1D. Гены резистентности к хинолонам встречались у 68,4% штаммов. Самыми распространенными генами были *qnrS1* (40% штаммов) и *qnrB1* (22,7%). Фенотипическая оценка чувствительности штаммов показала, что резистентностью к колистину обладали 23,5%, к карбапенемам — 64,7% штаммов. Гипермукоидным фенотипом обладали 32,9% изолятов *K. pneumoniae*, выделенные при флегмоне, пневмонии, сепсисе, перитоните. Наиболее распространенными сиквенс-типами оказались: ST395 (24,3%), ST23 (17,6%) и ST512 (9,5%).

Адрес для переписки:

Самойлова Анна Андреевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-94-85.
E-mail: samoilova@pasteurorg.ru

Contacts:

Anna A. Samoilova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-94-85.
E-mail: samoilova@pasteurorg.ru

Для цитирования:

Самойлова А.А., Краева Л.А., Михайлов Н.В., Сaitова А.Т., Полев Д.Е.,
Вашукова М.А., Гордеева С.А., Смирнова Е.В., Белятич Л.И.,
Долгова А.С., Шабалина А.В. Геномный анализ вирулентности
и антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae* //
Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 339–350. doi: 10.15789/2220-
7619-GAO-15645

Citation:

Samoilova A.A., Kraeva L.A., Mikhailov N.V., Saitova A.T., Polev D.E.,
Vashukova M.A., Gordeeva S.A., Smirnova E.V., Beljatic L.I., Dolgova A.S.,
Shabalina A.V. Genomic analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains virulence
and antibiotic resistance // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 339–350. doi: 10.15789/2220-
7619-GAO-15645

К капсульным типам K1 и K2 принадлежали 8% и 25,3% штаммов соответственно. Локус синтеза поликетидов *ybt*, характеризующий вирулентные штаммы, был выявлен у 69,3% изолятов, а локус *clb* присутствовал в 10,7% штаммов. У 73,3% и 14,7% штаммов были определены ассоциированные с плазмидой локусы вирулентности *iuc* и *iro* соответственно, которые кодируют биосинтез сидерофоров аэробактина и сальмохелина. Мы обнаружили 44 случая (58,7% штаммов) генотипической конвергенции вирулентности и антибиоткорезистентности, на что указывает одновременное наличие локуса аэробактина (*iuc*) и генов β-лактамаз или карбапенемаз. Таким образом, идентификация гипервирулентности может представлять ценную информацию для клинического ведения пациентов с hvKp-инфекциями. Поэтому очевидна необходимость разработки комплексного диагностического теста для одновременного скрининга множественно-устойчивых гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae*.

Ключевые слова: гипервирулентность, антибиоткорезистентность, полногеномное секвенирование, *Klebsiella pneumoniae*, hvKp, cKp.

GENOMIC ANALYSIS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS VIRULENCE AND ANTIBIOTIC RESISTANCE

Samoilova A.A.^a, Kraeva L.A.^{a,b}, Mikhailov N.V.^{a,c}, Saitova A.T.^a, Polev D.E.^a, Vashukova M.A.^d, Gordeeva S.A.^d, Smirnova E.V.^e, Beljatich L.I.^f, Dolgova A.S.^a, Shabalina A.V.^a

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

^b Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation

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

^d Clinical Infectious Diseases Hospital named after S.P. Botkin, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

^e Hygiene and Epidemiology Centre in St. Petersburg of Rospotrebnadzor, St. Petersburg, Russian Federation

^f St. Petersburg State Hospital No. 14, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Recently, *Klebsiella pneumoniae* strains have become widespread both in community-acquired infectious processes and in nosocomial infections. There are two pathotypes of *K. pneumoniae*: classical (cKp) and hypervirulent (hvKp). Representatives of any pathotype are prone to acquire and further transmit genetic factors of antibiotic resistance and virulence. This combination accounts for severity of the infectious process. Therefore, information about whether the strain belongs to either pathotype can help in prescribing proper therapy. Since there is no consensus upon hypervirulence marker, we attempted to find the most significant combinations of genetic markers of virulence and antibiotic resistance in *K. pneumoniae* strains. The study was aimed to conduct a genomic analysis of virulence and antibiotic resistance of *K. pneumoniae* clinical isolates. **Materials and methods.** There were examined 85 strains of *K. pneumoniae* isolated from diverse clinical material samples from patients in large St. Petersburg hospitals. In our work, we used classical bacteriological methods, including determination of the hypermucoviscous type using the “string test”, the mass spectrometric method (MALDI-ToF MS) for identifying bacteria, molecular methods for studying markers of virulence and antibiotic resistance (multilocus sequence typing, genome sequencing of *K. pneumoniae* strains). **Results.** Among the studied *K. pneumoniae* strains, the most common carbapenemase genes were OXA-48 (18.7%) and NDM-1 genes — 17.3% of strains; in 6.7% of strains, NDM-1 and OXA-48 genes were found simultaneously. The percentage of strains with β-lactamase genes CTX-M-15 was 54.7%, OXA-1 — 17.3%, TEM-1D — 13.3%, and in 17.3% of cases the OXA-1 and TEM-1D genes were simultaneously present in bacterial strains. Quinolone resistance genes were found in 68.4% of strains. The most common genes were *qnrS1* (40% of strains) and *qnrB1* (22.7%). Phenotypic antimicrobial susceptibility testing showed that 23.5% and 64.7% strains were resistant to colistin and carbapenems, respectively. 32.9% *K. pneumoniae* strains, isolated in patients with phlegmon, pneumonia, sepsis, and peritonitis, had a hypermucoid phenotype. The most common sequence types were: ST395 (24.3%), ST23 (17.6%) and ST512 (9.5%). 8% and 25.3% of strains belonged to capsule types K1 and K2, respectively. The polyketide synthesis locus *ybt*, which characterizes virulent strains, was detected in 69.3% isolates, and the *clb* locus was present in 10.7% of strains. In 73.3% and 14.7% strains, the plasmid-associated virulence loci *iuc* and *iro* were identified, which encode the biosynthesis of the siderophores aerobactin and salmochelin. We described 44 cases (58.7% of strains) of genotypic convergence of virulence and antibiotic resistance, as shown by simultaneously detected the aerobactin (*iuc*) locus and β-lactamase or carbapenemase genes. Thus, identification of hypervirulence may provide valuable information for the clinical management of patients with hvKp infections. Therefore, it is obviously necessary to develop comprehensive diagnostic test for simultaneous screening of multidrug-resistant hypervirulent *K. pneumoniae* strains.

Key words: hypervirulence, antibiotic resistance, genome-wide sequencing, *Klebsiella pneumoniae*, hvKp, cKp.

Введение

В настоящее время одним из наиболее распространенных оппортунистических внутрибольничных патогенов является *Klebsiella pneumoniae*, которая вызывает около трети инфекций, обусловленных грамотрицательными бактериями [27]. Среди штаммов *K. pneumoniae* выделяют два патотипа: классический (classical *K. pneumoniae* — сКр) и гипервирулентный (hypervirulent *K. pneumoniae* — hvКр). Большинство клебсиеллезных инфекций вызывают классические штаммы, которые являются оппортунистическими патогенами с низким уровнем вирулентности [3].

Наиболее распространенными инфекциями, связанными с *K. pneumoniae*, являются респираторные воспалительные процессы, инфекции мочевыводящих путей и хирургических ран, ассоциированные с оказанием медицинской помощи [10]. Факторами риска классических *K. pneumoniae*-инфекций считаются критический возраст (младенческий или пожилой), врожденные или приобретенные формы иммунодефицита, алкоголизм, сахарный диабет, хронические сердечные, почечные, легочные и неопластические заболевания [40].

Гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* способны вызывать внебольничные инфекции, даже у здоровых людей. Впервые обнаруженные в Азии, изоляты hvКр описаны как ведущая причина гнойных абсцессов печени [28]. Гипервирулентная *K. pneumoniae*, выделенная из гнойных абсцессов печени способна метастазировать в отдаленные участки, приводя к менингиту, некротизирующему фасцииту и эндофтальмиту [38].

В качестве биомаркеров для дифференциации клинических изолятов hvКр от сКр могут быть использованы генетические детерминанты вирулентности, входящие в состав мобильных генетических элементов, в том числе плазмид. Детерминанты вирулентности hvКр включают: системы сидерофоров для приобретения железа, высокое содержание капсульных полисахаридов (гипермукоидность), принадлежность к капсульным типам K1 или K2 и токсин колибактин (табл. 1) [5].

Гипервирулентность *K. pneumoniae* можно определить как способность бактерий вызывать инвазивные инфекции после появления первичного очага инфекции у здоровых взрослых [8]. Инфекции, вызванные гипервирулентными штаммами *K. pneumoniae*, зачастую соотносятся с клинической картиной заболевания, поскольку пока не существует универсального маркера гипервирулентности [31]. Гипермукоидный фенотип часто определяют при помощи «стринг-теста» [35].

Понятия «гипермукоидный» и «гипервирулентный» часто используются в литературе как синонимы; однако не все штаммы *K. pneumoniae* с гипервирулентным фенотипом имеют гипермукоидные бактерии, и не все гипермукоидные изоляты приводят к инвазивному синдрому [8].

Первые штаммы hvКр обнаруживали преимущественно в Азии; они лишь изредка были устойчивы к антимикробным препаратам (АМП). Однако последние публикации указывают, что штаммы hvКр становятся более распространенными и чаще обладают множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [14]. Появление изолятов *K. pneumoniae* с комбинированной гипервирулентностью и устойчивостью к резервным АМП, таким как карбапенемы, представляет серьезную опасность. При распространении устойчивости к АМП среди штаммов hvКр могут развиваться инфекции, трудно поддающиеся лечению, даже у здоровых взрослых. В случае если штаммы hvКр распространятся в медицинских учреждениях и будут вызывать инфекции у лиц с ослабленным иммунитетом, можно ожидать еще более высокую заболеваемость и смертность [14].

Поскольку обнаружение генов гипервирулентности не является частью процедур диагностической микробиологии, штаммы hvКр могут остаться незамеченными [14]. В то же время фенотипические тесты, такие как стринг-тест на гипермукоидность, имеют низкую чувствительность [29]. Клиническая диагностика и обнаружение hvКр являются сложной задачей и требуют молекулярного тестирования для надежной идентификации подобных штаммов [14].

Цель работы — выявление наиболее значимых комбинаций генетических маркеров вирулентности и антибиотикорезистентности для характеристики клинических изолятов *K. pneumoniae*.

Материалы и методы

Бактериальные изоляты. В работе исследовали 85 клинических штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из проб биоматериала от госпитализированных пациентов ряда клиник Санкт-Петербурга. Все изоляты были выделены из различных видов клинического материала: крови, мочи, мокроты, желчи, отделяемого из брюшной полости, содержимого абсцесса. Идентификацию изолятов до вида проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) с использованием спектрометра Microflex LRF и программным обеспечением «Biotyper RTC» (Bruker

Daltonik, Германия). Значения Score $\geq 2,0$ использовали в качестве критерия надежной видовой идентификации.

Гипермукоидный фенотип исследуемых штаммов определяли при постановке «стринг-теста» [35] с использованием суточной культуры возбудителя.

Оценка чувствительности штаммов *K. pneumoniae* к антимикробным препаратам. В работе оценивали чувствительность штаммов к 9-ти наиболее актуальным для этих микроорганизмов антимикробным препаратам (АМП): аминогликозидам (амикацин), карбапенемам (меропенем), ингибиторозащищенным пенициллинам (ампициллин/сульбактам, амоксициллин/клавуланат), сульфаниламидам (ко-тримоксазол), хинолонам (ципрофлоксацин), цефалоспорином (цефотаксим, цефепим). Резистентность к перечисленным АМП оценивали диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтон (HiMedia, Индия)

с помощью дисков ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера в соответствии с рекомендациями EUCAST раздела «Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters» (версия 13.0) [15] и российскими клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», версия 2018-03.

Определение чувствительности к колистину проводили методом серийных микроразведений согласно ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010 в бульоне Мюллера–Хинтон (HiMedia, Индия), приготовленного в соответствии с инструкцией производителя, в 96-ти луночных полистироловых планшетах (Медполимер, РФ). Для приготовления рабочего раствора колистина использовали субстанцию сульфата колистина (CAS Number 1264-72-8) в форме порошка (Sigma Aldrich, Германия). Колистин растворяли в стерильной дистиллированной

Таблица 1. Исследуемые гены биомаркеров для идентификации hvKp

Table 1. Biomarker genes for hvKp identification

Ген Gene	Функция Function	Размер ампликона, п.н. Amplicon size, bp	Ссылка Reference
<i>peg-344</i>	Предполагаемый транспортер метаболитов Putative metabolite transporter	411	36
<i>iroB</i>	Синтез сальмохелина Salmochelins synthesis	585	36
<i>iucA</i>	Синтез аэробактина Aerobactin synthesis	556	44
<i>rmpA</i>	Регулятор мукоидного фенотипа (<i>prmpA</i> — плазмидная локализация) Regulator of mucoid phenotype (<i>prmpA</i> — plasmid localization)	332	29
	<i>crmpA</i> — хромосомная локализация <i>crmpA</i> — chromosomal localization	588	29
<i>rmpA2</i>	Регулятор мукоидного фенотипа (<i>prmpA2</i> — плазмидная локализация) Regulator of mucoid phenotype (<i>prmpA2</i> — plasmid localization)	455	29
<i>uni-rmpA</i>	Праймер, нацеленный на гомологичную область всех зарегистрированных вариантов генов <i>rmpA</i> (<i>prmpA</i>, <i>prmpA2</i> и <i>crmpA</i>) Primer targeting the homologous region of all reported <i>rmpA</i> gene variants (<i>prmpA</i> , <i>prmpA2</i> and <i>crmpA</i>)	250	29
<i>terB</i>	Резистентность к теллуриду Resistance to tellurite	288	36
<i>peg-589</i>	Предполагаемая карбоксимуконолактон-декарбоксилаза Putative carboxymuconolactone decarboxylase	236	36
<i>entB</i>	Синтез энтеробактина Enterobactin synthesis	400	12
<i>irp2</i>	Синтез иерсиниабактина Yersiniabactin synthesis	230	36
<i>iutA</i>	Синтез аэробактина Aerobactin synthesis	920	12

воде до концентрации 12,8 мг/мл. Внесение раствора антибиотика в лунки планшетов осуществляли методом последовательных серийных двукратных разведений, при этом две последние лунки оставляли пустыми для положительного и отрицательного контролей. Результаты определения чувствительности интерпретировали в соответствии с рекомендациями EUCAST (версия 13.0) [15].

Секвенирование генома. Геномную бактериальную ДНК экстрагировали из клеточных колоний с использованием набора diaGene для выделения геномной ДНК из бактериальных клеток (Диаэм, Россия) и QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Хильден, Германия) в соответствии с инструкциями производителей. Для секвенирования геномов 75 изолятов *K. pneumoniae* брали по 500 нг ДНК бактерий и фрагментировали на приборе Covaris M220. Библиотеки ДНК готовили с помощью набора TruSeq DNA Nano (Illumina, США), с расчетом на средний размер вставки 550 п.н., по протоколу производителя. Секвенирование готовых библиотек осуществляли на приборе MiSeq с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3. Чтение проводили с двух сторон по 300 п.н.

Прочтения подготовили к сборке с помощью Trim Galore (version 0.6.7), качество прочтений проверяли программой FastQC (version 0.11.9). Сборку геномов *de novo* производили в программе SPAdes (version 3.15.5) [33]. Качество сборки анализировали с помощью QUAST (version 5.2.0) [17].

Определение MLST-типов (multi-locus sequence typing) штаммов, выявление локусов вирулентности, ассоциированных с транспозоном ICEKp (*ybt*, *clb*, *iro*, *rmpA*), плазмидных локусов вирулентности (*iro*, *iuc*, *rmpA*, *rmpA2*) и генетических детерминант устойчивости к АМП (мутации, приобретенные гены и собственные β-лактамазы) осуществляли с помощью ПО Kleborate [22]. Предсказание К и О серотипов проводили с помощью программы Kaptive [21, 43]

Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST-типирование). MLST-типирование изолятов проводили по схеме Diancourt и соавт. [13]. Семь генов домашнего хозяйства (*gapA*, *mdh*, *gpi*, *rpoB*, *inf*, *phoE* и *tonB*) сравнивали с последовательностями, доступными в базе данных MLST *K. pneumoniae* (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella>).

Результаты

Характеристика гипермукоидных свойств бактериальных штаммов. Среди 85 клинических изолятов *K. pneumoniae* на основании «стринг-теста» выявлено 28 (32,9%) изолятов с гипермукоидным фенотипом и 57 (67,1%) изолятов с классическим фенотипом.

Оценка чувствительности штаммов *K. pneumoniae* к антимикробным препаратам. Среди 85 изолятов *K. pneumoniae* 10,6% оказались панрезистентными (pandrug-resistant — PDR), то есть устойчивыми ко всем исследуемым АМП, в том числе к колистину. Указанные штаммы принадлежали к следующим сиквенс-типам: ST395, ST512, ST307, ST11 и ST23. Широкая лекарственная устойчивость (extensively drug-resistant — XDR), то есть отсутствие чувствительности

Таблица 2. Частота встречаемости генов карбапенемазы и БЛРС у штаммов *K. pneumoniae*

Table 2. Prevalence of carbapenemase and ESBL genes in *K. pneumoniae* strains

Ген Gene	Частота встречаемости, % Prevalence, %
Приобретенные β-лактамазы Acquired β-lactamases	
OXA-1	17,3
OXA-1, TEM-1D	17,3
TEM-1D	13,3
OXA-9, TEM-1D	2,6
БЛРС ESBL	
CTX-M-15	54,7
CTX-M-3	1,3
CTX-M-55	1,3
ADC-11*, CTX-M-15, PER-1**	1,3
Карбапенемазы Carbapenemase	
NDM-1	17,3
NDM-1, OXA-48	6,7
NDM-5	4,0
NDM-5, OXA-48	1,3
OXA-48	18,7
OXA-66	1,3
OXA-232	1,3
KPC-3	5,3
KPC-3, NDM-1	4,0
KPC-2, OXA-48	1,3

Примечание. *ADC — Acinetobacter Derived Cephalosporinase, относятся к ферментам класса C, **PER — Pseudomonas Extended Resistant.

Note. *ADC — Acinetobacter Derived Cephalosporinase, belongs to class C enzymes, **PER — Pseudomonas Extended Resistant.

по крайней мере к одному агенту из всех категорий АМП, наблюдалась у 41,2% штаммов. Эти штаммы принадлежали к следующим сиквенс-типам: ST13, S15, ST23, ST39, ST86, ST147, ST307, ST395, ST512. Множественная устойчивость (MDR), то есть устойчивость микроорганизма

к АМП из трех различных групп, встречалась у 32,9% штаммов. Такие штаммы принадлежали к следующим сиквенс-типам: ST13, ST20, ST23, ST39, ST307, ST395, ST512, ST556, ST874 и др.

Детерминанты устойчивости к антимикробным препаратам на основании секвенирования

Таблица 3. Характеристика штаммов *K. pneumoniae* на основании принадлежности к сиквенс-типу и фенотипу гипермукоидности

Table 3. Characteristics of *K. pneumoniae* strains based on belonging to the sequence type and hypermucoid phenotype

Капсульный тип (N) Capsule type (N)	ST-тип ST type	N изолятов (%) N isolates (%)	
		Положительный стринг-тест Positive string test	Отрицательный стринг-тест Negative string test
K1 (6)	ST23	6 (8,1%)	0
K2 (19)	ST395	6 (8,1%)	6 (8,1%)
	ST86	2 (2,7%)	1 (1,35%)
	ST86-1LV	1 (1,35%)	0
	ST11	0	1 (1,35%)
	ST65	1 (1,35%)	0
	ST380	1 (1,35%)	0
K3 (3)	ST13	0	3 (4,1%)
K4 (1)	ST37	0	1 (1,35%)
K14 (1)	ST37	0	1 (1,35%)
K19 (4)	ST15	0	3 (4,1%)
	ST2237	0	1 (1,35%)
K20 (2)	ST147	1 (1,35%)	1 (1,35%)
K23 (4)	ST39	0	4 (5,4%)
K24 (4)	ST15	0	1 (1,35%)
	ST20	1 (1,35%)	0
	ST86	1 (1,35%)	0
	ST359	0	1 (1,35%)
K39 (4)	ST395	0	4 (5,4%)
K45 (2)	ST874	0	2 (2,7%)
K57 (7)	ST23	0	7 (9,45%)
K62 (2)	ST39	0	1 (1,35%)
	ST556	0	1 (1,35%)
K64 (2)	ST395	1 (1,35%)	1 (1,35%)
Другие типы Other types KL102, KL107 (13)	ST307	0	5 (6,75%)
	ST512	2 (2,7%)	5 (6,75%)
	ST15	0	1 (1,35%)
Всего 74 Total 74		23 (31,05%)	51 (68,95%)

Примечание. K, KL – капсульный тип, N – количество изолятов, ST – сиквенс-тип.

Note. K, KL – capsule type, N – number of isolates, ST – sequence type.

генома. По результатам полногеномного секвенирования 75 изолятов *K. pneumoniae* у 81,3% были обнаружены гены резистентности к аминогликозидам, у 68,4% — к фторхинолонам, у 43,4% — к макролидам. Гены резистентности к фениколам были обнаружены у 72,4% штаммов, а к сульфаниламидам у 65,8% изолятов. Ген резистентности к рифампицину (*arr-2*) был характерен для 11,8% изолятов, к тетрациклину (*tetA*) — 35,5%, а гены устойчивости к триметоприму — 71,1% изолятов.

С помощью программы Kleborate исследовали частоту встречаемости генов карбапенемаз и β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у штаммов *K. pneumoniae* (табл. 2).

На основании программы Kleborate оценивали индекс устойчивости (resistance score) исследованных штаммов к антимикробным препаратам:

0 — отсутствие БЛРС, отсутствие карбапенемаз (независимо от резистентности к колистину);

1 — наличие БЛРС, отсутствие карбапенемаз (независимо от резистентности к колистину);

2 — наличие карбапенемаз, отсутствие устойчивости к колистину (независимо от БЛРС или мутаций *OmpK*);

3 — наличие карбапенемаз и резистентности к колистину (независимо от БЛРС или мутаций *OmpK*).

Среди исследованных 75 штаммов *K. pneumoniae* индексом резистентности 3 обладали 5,3% штаммов, индексом 2 — 57,3%, индексом 1 — 18,7%, а индексом 0 — 18,7%.

Определение капсульных типов (K-типов). Гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* наиболее часто принадлежат к капсульным типам K1 и K2, которые обеспечивают вирулентные свойства клебсиелл в комбинации с другими детерминантами [1].

На основании данных полногеномного секвенирования были определены капсульные типы. Среди 75 исследованных изолятов 8% и 25,3% штаммов принадлежали к типу K1 и K2 соответственно. Были обнаружены другие капсульные типы hvKp: K20 — 2,6%, K57 — 9,2%, K64 — 2,6%. Остальные штаммы принадлежали к капсульным типам, характерным для классических клебсиелл (K3, K14, K15, K19, K23, K24, K39, K45, K62). В ходе исследования были обнаружены типы KL102, KL107, KL112, для которых соответствующие серологические типы капсул еще предстоит определить.

MLST-типирование. Гипервирулентные штаммы наиболее часто имеют следующие сиквенс-типы: ST23, ST57 (ассоциированы с капсульным типом K1), ST86, ST375 и ST380 (ассоциированы с капсульным типом K2) [37].

По результатам MLST-типирования идентифицировано 18 различных ST-типов для 74 исследованных изолятов, для одного изолята ST-тип определить не удалось (NA). Наиболее распространенные типы — ST395 (24,3%), ST23 (17,6%) и ST512 (9,5%). Также были обнаружены следующие типы: ST11 (1,4%), ST86 (6,8%, включая ST86–1LV, в котором один локус не соответствовал типу ST86), ST65 (1,4%), ST307 (6,8%).

Все штаммы *K. pneumoniae* капсульного типа K1 (n = 6) принадлежали к сиквенс-типу ST23. Для типа K2 12 изолятов принадлежали к ST395, 4 изолята — к ST86 (включая ST86–1LV), и по 1 штамму — к ST11, ST65 и ST380. Два штамма K20 принадлежали к ST147, семь изолятов K57 — к ST23 и два штамма K64 *K. pneumoniae* принадлежали к ST395 (табл. 3).

Локусы вирулентности. На основании наличия генов, кодирующих иерсиниабактин (*ybt*), колибактин (*clb*) и аэробактин (*iuc*), оценивали индекс вирулентности (virulence score). В соответствии с программой Kleborate [22] индекс вирулентности варьируется от 0 до 5:

0 — отсутствие перечисленных генов;

1 — наличие иерсиниабактина;

2 — наличие иерсиниабактина и колибактина (или только колибактина);

3 — наличие аэробактина (без иерсиниабактина или колибактина);

4 — наличие аэробактина и иерсиниабактина (без колибактина);

5 — наличие всех трех генов вирулентности.

Среди 75 исследованных штаммов индексом вирулентности 5 обладали 10,7% штаммов, индексом 4 — 37,3%, индексом 3 — 25,3% штаммов, индексом 2 — 0%, индексом 1 — 21,3%, индексом 0 — 5,3%.

Обсуждение

Фенотипическая оценка чувствительности 85 клинических изолятов *K. pneumoniae* в нашем исследовании показала следующие результаты: PDR — 10,6%, XDR — 41,2%, MDR — 32,9%. Среди них резистентностью к колистину обладали 23,5%, к карбапенемам — 64,7% штаммов. В работе по исследованию антибиотикорезистентности изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из крови больных COVID-19 [4], чувствительными к АМП были только 4% изолятов.

Устойчивость к карбапенемам может быть опосредована продукцией карбапенемаз или сочетанием нарушения экспрессии порина на внешней мембране и продукции различных β-лактамаз [20]. Карбапенемазы могут придавать штаммам резистентность практически ко всем известным β-лактамам АМП. В исследовании продукции карбапенемаз нозоко-

миальными штаммами в Санкт-Петербурге [2] наиболее часто обнаруживали карбапенемазы NDM-1, реже OXA-48 и KPC-2. По результатам проведенной нами работы самыми распространенными генами карбапенемаз были гены OXA-48 (18,7%) и NDM-1 — 17,3% штаммов, а в 6,7% штаммов гены NDM-1 и OXA-48 присутствовали одновременно.

Доля штаммов с генами β -лактамаз CTX-M-15 в нашем исследовании составила 54,7%, OXA-1 — 17,3%, TEM-1D — 13,3%, и в 17,3% случаев в штаммах одновременно присутствовали гены OXA-1 и TEM-1D.

K. pneumoniae обладает всеми известными механизмами устойчивости грамотрицательных бактерий к хинолонам [34], включая модификацию гена-мишени, защиту мишени, активное выведение АМП (эффлюкс) и инактивацию ферментами. В проведенном нами исследовании гены резистентности к хинолонам встречались у 68,4% штаммов. Самыми распространенными генами были *qnrS1* (40% штаммов) и *qnrB1* (22,7%).

Гипервирулентность штамма часто ассоциирована с гипермукоидностью. Бактериальная слизь является прямым следствием того, что происходит сброс капсульного материала во внеклеточную среду, а значит, гипермукоидность штамма связана с уровнем продукции капсульных полисахаридов [5]. По результатам нашего исследования 32,9% изолятов *K. pneumoniae* обладали гипермукоидным фенотипом на основании стринг-теста. Данные штаммы вызывали следующие заболевания: флегмону, пневмонию, сепсис, перитонит. В статье Луо с соавт. 29% клинических изолятов, вызывающих первичный абсцесс печени, не проявляли гипермукоидного фенотипа, связанного с hvKp [26]. Данные результаты предполагают, что гипервирулентный фенотип не имеет прямой зависимости от гипермукоидности. Следовательно, гипервирулентность должна определяться не только фенотипом, но также генотипом и клиническими характеристиками инфекции. Другими словами, гипервирулентность выходит за рамки капсульного серотипа и положительного стринг-теста [26]. Однако стринг-тест является сигналом того, что клинический изолят может быть гипервирулентным. Таким образом, отсутствие гипермукоидности не исключает гипервирулентность штамма [8].

У *K. pneumoniae* существует большое внутривидовое разнообразие структуры геномов, для классификации которых используется многолокусное типирование последовательностей (MLST) [13]. Полученные в результате классификации типы последовательности (ST) являются клинически значимыми [11].

По результатам проведенной нами работы наиболее распространены следующие сиквенс-типы: ST395 (24,3%), ST23 (17,6%) и ST512 (9,5%). Также обнаружены следующие типы: ST11 (1,4%), ST86 (6,8%, включая ST86-1LV, в котором один локус не соответствовал типу ST86), ST65 (1,4%), ST307 (6,8%). Все штаммы, принадлежащие к ST23 K1 (8,1%), обладали положительным стринг-тестом, а все штаммы ST23 K57 (9,45%) обладали отрицательным тестом на гипермукоидность. Штаммы, относящиеся к капсульным типам K3, K4, K14, K19, K23, K39, K45, K57, K62 в 100% случаев демонстрировали отрицательный стринг-тест.

Среди штаммов с ST23 один был устойчив ко всем исследуемым АМП (пан-резистентный), три изолята были устойчивы ко всем АМП, за исключением одного (колистина или котримоксазола), и 6 штаммов проявляли множественную лекарственную устойчивость. PDR штамм ST23 принадлежал к капсульному типу K57 и обладал генами резистентности к аминогликозидам (*aac(6')-Ib*; *rmtF*), фторхинолонам (*qnrB1*), фениколам (*catA1*), рифампицину (*arr-2*), а также генами β -лактамаз OXA-48 и CTX-M-15.

Другой идентификатор hvKp — тип капсулы (K). В результате полногеномного секвенирования нами были определены капсульные типы клинических изолятов *K. pneumoniae*. Среди 75 исследованных штаммов 8% и 25,3% штаммов принадлежали к типу K1 и K2 соответственно. Были обнаружены другие капсульные типы hvKp: K20 — 2,6%, K57 — 9,2%, K64 — 2,6%. Остальные штаммы принадлежали к капсульным типам, характерным для классических клебсиелл (K3, K14, K15, K19, K23, K24, K39, K45, K62). В ходе исследования были обнаружены типы KL102, KL107, KL112, для которых соответствующие серологические типы капсул еще предстоит определить.

Хорошо охарактеризованные детерминанты вирулентности у *K. pneumoniae* включают локусы синтеза поликетидов *ybt* и *clb* (также известные как *pks*), кодирующие сидерофоры иерсиниабактин и генотоксин колибактин соответственно. Эти локусы расположены в мобильном генетическом элементе ICEKp, который является наиболее распространенным генетическим элементом, связанным с вирулентностью *K. pneumoniae* [22]. В исследовании, посвященном генетическому разнообразию мобильного элемента ICEKp [22], локус *ybt* был обнаружен в 40% геномов *K. pneumoniae* среди штаммов, связанных с инвазивными инфекциями. Локус *clb* присутствовал в 14% всех геномов *K. pneumoniae* (38,4% геномов *ybt+*).

В проведенном нами исследовании локус *ybt* был характерен для 69,3% изолятов и был

ассоциирован с 7 различными интегративными мобильными элементами ICEKp и одной плазмидой, а локус *clb* присутствовал в 10,7% штаммов. Самыми распространенными мобильными элементами были ICEKp4 ($n = 10$) и ICEKp10 ($n = 8$). Мобильный элемент ICEKp10 также несет локус генотоксина колибактина (*clb*) и вероятно связан с гипервирулентными штаммами. Таким образом, мобильные генетические элементы, несущие *ybt* и *clb*, свободно циркулируют в популяции *K. pneumoniae*, в том числе среди штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. Данные локусы следует рассматривать как мишень для геномного надзора вместе с детерминантами антибиотикорезистентности [22].

Другие важные кластеры генов вирулентности кодируют биосинтез сидерофоров аэробактерии (*iuc*) и сальмохелина (*iro*), связаны с инвазивными заболеваниями и распространены среди гипервирулентных клонов *K. pneumoniae*, вызывающих тяжелые внебольничные инфекции, такие как абсцесс печени и пневмония [24]. В ходе работы были определены ассоциированные с плазмидой локусы *iuc* (73,3%) и *iro* (14,7%). Линия *iuc1* была наиболее распространенным вариантом локуса *iuc* ($n = 54$). Данный локус обычно располагается на плазмиде вирулентности KpVP-1 (pLVPK и pK2044-подобные плазмиды) [24]. Другая линия *iuc2* связана с плазмидой KpVP-2 (Kp52.145pII-подобный) [24] и была обнаружена в одном штамме (ST380, K2).

Гены *rmpA* и *rmpA2* связаны с гипермукоидным фенотипом, который является признаком вирулентности, часто наблюдаемым у гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae*. Недавняя работа [41] показала, что *rmpA* служит регулятором транскрипции для генов *rmpD* и *rmpC*, и вместе эти гены составляют локус *rmpADC*. Ген *rmpC* участвует в усилении экспрессии капсулы, в то время как *rmpD* связан с гипермукоидностью. По результатам работы ген *rmpA* был характерен для 49,3% изолятов, а ген *rmpA2* — для 58,7%.

Мы обнаружили 44 случая (58,7% штаммов) генотипической конвергенции вирулентности и антибиотикорезистентности, на что указывает одновременное наличие локуса аэробактерии (*iuc*) и генов β -лактамаз или карбапенемаз. Среди них встречались как штаммы, принадлежащие к гипервирулентным сиквенс-типам (ST11, ST23, ST86), которые приобрели генетические детерминанты антибиотикорезистентности, так и множественно-резистентные штаммы с приобретенными плазмидами вирулентности. По литературным данным штаммы *K. pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью принадлежат к ST17, ST101,

ST258, ST307 [19, 32]. По результатам секвенирования нами были обнаружены клинические изоляты ($n = 5$), принадлежащие к ST307, с приобретенным интегративным мобильным элементом ICEKp4. Данные штаммы обладали также генами карбапенемаз (NDM-1, OXA-48) и β -лактамаз (CTX-M-15).

Среди конвергентных штаммов с сиквенс-типами hvKp два штамма были устойчивы ко всем исследуемым антибиотикам, шесть штаммов проявляли экстремальную лекарственную устойчивость (5 из них сохраняли чувствительность к колистину и 1 — к котримоксазолу) и шесть штаммов являлись множественно-устойчивыми.

Детерминанты устойчивости к АМП и детерминанты вирулентности обычно мобилизуются на плазмидах, поэтому их конвергенция внутри отдельных штаммов не является неожиданной. Мозаичная природа плазмид *K. pneumoniae* создает риск конвергенции детерминант резистентности и вирулентности в пределах одной плазмиды. Такие векторы hv-АБР могут распространяться среди клинических штаммов и придавать им способность вызывать серьезные инфекции у здоровых людей с очень ограниченными вариантами лечения [23].

Идентификация hvKp как инфекционного агента имеет большое значение. Если инфекция вызвана hvKp, это может указывать лечащему врачу на необходимость проведения дополнительных исследований (компьютерная томография (КТ) или магнитно-резонансная томография (МРТ)) с целью обнаружения трудно диагностируемых очагов инфекции [30]. Идентификация некоторых скрытых очагов инфекции (эндофтальмита, абсцесса головного мозга, предстательной железы, менингита) важна, поскольку режим дозирования АМП специфичен для каждого очага. Необходимы адекватные концентрации препарата для достижения оптимального результата лечения [25].

Гипермукоидный фенотип hvKp может вызывать затруднения при лечении абсцессов. Повышенная вязкость изолятов может препятствовать чрескожному дренированию и увеличивать вероятность закупорки катетера [32, 39]. Инфекция hvKp может быть связана с рецидивами [9, 16, 18, 42]. Когда hvKp идентифицируется как инфекционный агент, может потребоваться более длительный курс лечения, чтобы максимизировать показатели излечения и свести к минимуму рецидивы.

Таким образом, идентификация гипервирулентности может представлять ценную информацию для клинического ведения пациентов с hvKp-инфекциями.

Выводы

1. В результате геномного анализа вирулентности и антибиотикорезистентности клинических изолятов *K. pneumoniae* установлено, что 54,7% штаммов имели гены β-лактамаз СТХ-М-15, а 68,4% — гены резистентности к хинолонам.

2. Фенотипическая оценка чувствительности к антибиотикам показала, что резистентностью к карбапенемам обладали 64,7% штаммов, а гипермукоидным фенотип характерен для 32,9% изолятов *K. pneumoniae*.

3. У 58,7% штаммов обнаружена генотипическая конвергенция вирулентности и анти-

биотикорезистентности, на что указывает одновременное наличие локуса аэробактина (*iuc*) и генов β-лактамаз или карбапенемаз.

Заключение

Таким образом, идентификация гипервирулентности может представлять ценную информацию для клинического ведения пациентов с hνKp-инфекциями. Поэтому очевидна необходимость разработки комплексного диагностического теста для одновременного скрининга множественно-устойчивых гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae*.

Список литературы/References

1. Агеевец В.А., Агеевец И.В., Сидоренко С.В. Конвергенция множественной резистентности и гипервирулентности у *Klebsiella pneumoniae* // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 450–460. [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. Баранцевич Е.П., Баранцевич Н.Е., Шляхто Е.В. Продукция карбапенемаз нозокомиальными штаммами *K. pneumoniae* в Санкт-Петербурге // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2016. Т. 18, № 3. С. 196–200. [Barantsevich E.P., Barantsevich N.E., Shlyakhto E.V. Production of Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* Isolated in Saint-Petersburg. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, vol. 18, no. 3, pp. 196–200. (In Russ.)]
3. Комисарова Е.В., Воложанцев Н.В. Гипервирулентная *Klebsiella pneumoniae* – новая инфекционная угроза // Инфекционные болезни. 2019. Т. 17, № 3. С. 81–89. [Komisarova E.V., Volozhantsev N.V. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a new infectious threat. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2019, vol. 17, no. 3, pp. 81–89. (In Russ.)] doi: 10.20953/1729-9225-2019-3-81-89
4. Малыгин А.С., Андреев С.С., Царенко С.В., Петрушин М.А. Антибиотикорезистентность изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из крови больных COVID-19 // Медицина. 2021. Т. 9, № 2. С. 63–74. [Malygin A.S., Andreev S.S., Tsarenko S.V., Petrushin M.A. Antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from the blood of patients with COVID-19. *Meditina = Medicine*, 2021, vol. 9, no. 2, pp. 63–74. (In Russ.)] doi: 10.29234/2308-9113-2021-9-2-63-74
5. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Подопривога И.В., Шагин Д.А. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020. Т. 22, № 1. С. 4–19. Chebotar I.V., Bocharova Yu.A., Podoprivoga I.V., Shagin D.A. The reasons why *Klebsiella pneumoniae* becomes a leading opportunistic pathogen. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2020, vol. 22, no. 1, pp. 4–19. (In Russ.) doi: 10.36488/cmasc.2020.1.4-19
6. Bodena D., Teklemariam Z., Balakrishnan S., Tesfa T. Bacterial contamination of mobile phones of health professionals in Eastern Ethiopia: antimicrobial susceptibility and associated factors. *Trop. Med. Health*, 2019, vol. 47, no. 15: 47. doi: 10.1186/s41182-019-0144-y
7. Bulger J., MacDonald U., Olson R., Beanan J., Russo T.A. Metabolite transporter PEG344 is required for full virulence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain hνKPI after pulmonary but not subcutaneous challenge. *Infect. Immun.*, 2017, vol. 85, no. 10, e00093-17. doi: 10.1128/IAI.00093-17
8. Catalan-Najera J.C., Garza-Ramos U., Barrios-Camacho H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes. *Virulence*, 2017, vol. 8, no. 7, pp. 1111–1123. doi: 10.1080/21505594.2017.1317412
9. Chang C.M., Ko W.C., Lee H.C., Chen Y.M., Chuang Y.C. *Klebsiella pneumoniae* psoas abscess: predominance in diabetic patients and grave prognosis in gas-forming cases. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2001, vol. 34, no. 3, pp. 201–206.
10. Chaudhary P., Bhandari D., Thapa K., Thapa P., Shrestha D., Chaudhary H.K., Shrestha A., Parajuli H., Gupta, B.P. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infected patients. *Journal of Nepal Health Research Council*, 2016, vol. 14, no. 33, pp. 111–115.
11. Choby J.E., Howard-Anderson J., Weiss D.S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* — clinical and molecular perspectives. *J. Intern. Med.*, 2020, vol. 287, no. 3, pp. 283–300. doi: 10.1111/joim.13007
12. Compain F., Babosan A., Brisse S., Genel N., Ailloud F., Kassis-Chikhani N., Arlet G., Decré D., Doern G.V. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 12, pp. 4377–4380. doi: 10.1128/JCM.02316-14
13. Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P.A., Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 8, pp. 4178–4182. doi: 10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005
14. European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 carrying carbapenemase genes in EU/EEA countries. 17 March 2021. ECDC: Stockholm; 2021.
15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (2023). URL: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints (11.02.2023)

16. Fierer J., Walls L., Chu P. Recurring *Klebsiella pneumoniae* pyogenic liver abscesses in a resident of San Diego, California, due to a K1 strain carrying the virulence plasmid. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49, no. 12, pp. 4371–4373. doi: 10.1128/JCM.05658-11
17. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G., QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 2013, vol. 29, no. 8, pp. 1072–1075. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086
18. Harada S., Tateda K., Mitsui H., Hattori Y., Okubo M., Kimura S., Sekigawa K., Kobayashi K., Hashimoto N., Itoyama S., Nakai T., Suzuki T., Ishii Y., Yamaguchi K. Familial spread of a virulent clone of *Klebsiella pneumoniae* causing primary liver abscess. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49, no. 6, pp. 2354–2356. doi: 10.1128/JCM.00034-11
19. Hetland M.A.K., Hawkey J., Bernhoff E., Bakksjø R.J., Kaspersen H., Rettedal S.I., Sundsfjord A., Holt K.E., Löhr I.H. Within-patient and global evolutionary dynamics of *Klebsiella pneumoniae* ST17. *bioRxiv*, 2022, vol. 11, no. 1: 514664. doi: 10.1101/2022.11.01.514664
20. Huang T.S., Lee S.S.J., Lee C.C., Chang F.C. Detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* on the basis of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry by using supervised machine learning approach. *PLoS One*, 2020, vol. 15, no. 2, e0228459. doi: 10.1371/journal.pone.0228459
21. Lam M.M.C., Wick R.R., Judd L.M., Holt K.E., Wyres K.L. Kaptive 2.0: updated capsule and lipopolysaccharide locus typing for the *Klebsiella pneumoniae* species complex. *Microbial Genomics*, 2022, vol. 8, no. 3: 000800. doi: 10.1099/mgen.0.000800
22. Lam M.M.C., Wick R.R., Wyres K.L., Gorrie C.L., Judd L.M., Jenney A.W.J., Brisse S., Holt K.E. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microb. Genom.*, 2018, vol. 4, no. 9: e000196. doi: 10.1099/mgen.0.000196
23. Lam M.M.C., Wyres K.L., Wick R.R., Judd L.M., Fostervold A., Holt K.E., Lohr I.H. Convergence of virulence and MDR in a single plasmid vector in MDR *Klebsiella pneumoniae* ST15. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2019, vol. 74, no. 5, pp. 1218–1222. doi: 10.1093/jac/dkz028
24. Lam M.M.C., Wyres K.L., Judd L.M., Wick R.R., Jenney A., Brisse S., Holt K.E. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Genome Med.*, 2018, vol. 10, no. 1: 77. doi: 10.1186/s13073-018-0587-5
25. Liu Y.C., Cheng D.L., Lin C.L. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Arch. Intern. Med.*, 1986, vol. 146, no. 10, pp. 1913–1916. doi: 10.1001/archinte.1986.00360220057011
26. Luo Y., Wang Y., Ye L., Yang J. Molecular epidemiology and virulence factors of pyogenic liver abscess causing *Klebsiella pneumoniae* in China. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2014, vol. 20, no. 11: 0818–24. doi: 10.1111/1469-0691.12664
27. 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
28. Paczosa M.K., Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2016, vol. 80, no. 3, pp. 629–661. doi: 10.1128/MMBR.00078-15
29. Parrott A.M., Shi J., Aaron J., Green D.A., Whittier S., Wu F. Detection of multiple hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in a New York City hospital through screening of virulence genes. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2021, vol. 27, no. 4, pp. 583–589. doi: 10.1016/j.cmi.2020.05.012
30. Patel P.K., Russo T.A., Karchmer A.W. Brief report on hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Open Forum Infect. Dis.*, 2014, vol. 1, no. 1, ofu028. doi: 10.1093/ofid/ofu028
31. Pomakova D.K., Hsiao C.B., Beanan J.M., Olson R., Macdonald U., Keynan Y., Russo T.A. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and under-recognized pathogenic variant. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2012, vol. 31, no. 6, pp. 981–989. doi: 10.1007/s10096-011-1396-6
32. Popa L.I., Gheorghe I., Barbu I.C., Surleac M., Paraschiv S., Măruțescu L., Popa M., Pircălăbioru G.G., Talapan D., Niță M., Streinu-Cercel A., Streinu-Cercel A., Oțelea D., Chifiriuc M.C. Multidrug Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 Clone Survival Chain From Inpatients to Hospital Effluent After Chlorine Treatment. *Front. Microbiol.*, 2021, vol. 11, 610296. doi: 10.3389/fmicb.2020.610296
33. Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler. *Curr. Protoc. Bioinformatics*, 2020, vol. 70: e102. doi: 10.1002/cpbi.102
34. Redgrave L.S., Sutton S.B., Webber M.A., Piddock L.J. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.*, 2014, vol. 22, no. 8, pp. 438–445. doi: 10.1016/j.tim.2014.04.007
35. Regueiro V., Campos M.A., Pons J., Alberti S., Bengoechea J.A. The uptake of a *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide mutant triggers an inflammatory response by human airway epithelial cells. *Microbiology*, 2006, vol. 152, no. 2, pp. 555–566. doi: 10.1099/mic.0.28285-0
36. 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: e00776-18. doi: 10.1128/JCM.00776-18
37. Shon A.S., Bajwa R.P., Russo T.A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*, 2013, vol. 4, no. 2, pp. 107–118. doi: 10.4161/viru.22718
38. Siu L.K., Yeh K.M., Lin J.C., Fung C.P., Chang F.Y. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *Lancet Infect. Dis.*, 2012, vol. 12, no. 11, pp. 881–887. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70205-0
39. Tan Y.M., Chung A.Y., Chow P.K., Cheow P.C., Wong W.K., Ooi L.L., Soo K.C. An appraisal of surgical and percutaneous drainage for pyogenic liver abscesses larger than 5 cm. *Ann. Surg.*, 2005, vol. 241, no. 3, pp. 485–490. doi: 10.1097/01.sla.0000154265.14006.47
40. Tsay R.W., Siu L.K., Fung C.P., Chang F.Y. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Arch. Intern. Med.*, 2002, vol. 162, no. 9, pp. 1021–1027. doi: 10.1001/archinte.162.9.1021
41. Walker K.A., Miner T.A., Palacios M., Trzilova D., Frederick D.R., Broberg C.A., Sepúlveda V.E., Quinn J.D., Miller V.L. A *Klebsiella pneumoniae* Regulatory Mutant Has Reduced Capsule Expression but Retains Hypermucoviscosity. *mBio*, 2019, vol. 10, no. 2: e00089-19. doi: 10.1128/mBio.00089-19

42. Wang J.H., Liu Y.C., Lee S.S., Yen M.Y., Chen Y.S., Wang J.H., Wann S.R., Lin H.H. Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin. Infect. Dis.*, 1998, vol. 26, no. 6, pp. 1434–1438. doi: 10.1086/516369
43. Wyres K.L., Wick R.R., Gorrie C., Jenney A., Follador R., Thompson N., Holt K.E. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microbial Genomics*, 2016, vol. 2, no. 12: e000102. doi: 10.1099/mgen.0.000102
44. Yu W.L., Ko W.C., Cheng K.C., Lee C.C., Lai C.C., Chuang Y.C. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2008, vol. 62, no. 1, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.007

Авторы:

Самойлова А.А., младший научный сотрудник лаборатории биопрепаратов 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;

Михайлов Н.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории биопрепаратов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры микробиологии и вирусологии института медицинского образования ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия;

Сайтова А.Т., лаборант-исследователь группы метагеномных исследований ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Полев Д.Е., к.б.н., старший научный сотрудник, руководитель группы метагеномных исследований ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Вашукова М.А., к.м.н., зам. главного врача по развитию медицинской помощи Клинической инфекционной больницы им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия;

Гордеева С.А., врач-бактериолог высшей категории, зав. централизованной бактериологической лабораторией Клинической инфекционной больницы им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия;

Смирнова Е.В., врач-бактериолог высшей категории, зав. бактериологической лабораторией ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге, Санкт-Петербург, Россия;

Белятич Л.И., врач-бактериолог высшей категории, зав. бактериологической лабораторией Городской больницы № 14, Санкт-Петербург, Россия;

Долгова А.С., к.б.н., зав. лабораторией 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.

Authors:

Samoilova A.A., Junior Researcher, Laboratory of Biological Products, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Kraeva L.A., DSc (Medicine), Head of the Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Microbiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation;

Mikhailov N.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Biological Products, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Microbiology and Virology, Institute of Medical Education, V.A. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation;

Saitova A.T., Laboratory Assistant-Researcher, Metagenomic Research Group, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Polev D.E., PhD (Biology), Senior Researcher, Head of the Metagenomic Research Group, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Vashukova M.A., PhD (Medicine), Deputy Chief Physician for Medical Care Development, Clinical Infectious Diseases Hospital named after S.P. Botkin, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;

Gordeeva S.A., Bacteriologist, Head of the Centralized Bacteriological Laboratory, Clinical Infectious Diseases Hospital named after S.P. Botkin, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;

Smirnova E.V., Bacteriologist, Head of the Bacteriological Laboratory, Hygiene and Epidemiology Centre in St. Petersburg of Rospotrebnadzor, St. Petersburg, Russian Federation;

Beljatich L.I., Bacteriologist, Head of the Bacteriological Laboratory, St. Petersburg State Hospital No. 14, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;

Dolgova A.S., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Genetics of Pathogenic Microorganisms, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Shabalina A.V., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Genetics of Pathogenic Microorganisms, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 15.09.2023
Отправлена на доработку 25.02.2024
Принята к печати 16.05.2024

Received 15.09.2023
Revision received 25.02.2024
Accepted 16.05.2024

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ У ВЗРОСЛЫХ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

М.И. Попкова¹, Е.Н. Филатова¹, С.В. Минаева², Н.В. Неумоина¹, К.М. Перфилова¹,
О.В. Уткин¹

¹ ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

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

Резюме. Коинфицирование вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ) — актуальная медико-биологическая проблема. Цель исследования — оценить частоту выявления и вирусную нагрузку ВЭБ в лейкоцитах крови у взрослых ВИЧ-инфицированных пациентов. Материалом исследования послужили лейкоциты крови 138 ВИЧ(+) и 68 ВИЧ(–) лиц в возрасте 20–69 лет. Количественное определение ДНК ВЭБ выполнено методом ПЦР в реальном времени. Статистический анализ проводили дифференцированно по стадиям ВИЧ-инфекции, содержанию CD4⁺ Т-лимфоцитов, приверженности антиретровирусной терапии. В результате показано, что ДНК ВЭБ у ВИЧ(+) пациентов выявляли значительно чаще, чем у ВИЧ(–) лиц (70,3±3,9% и 48,5±6,1%, $p = 0,008$). Вирусная нагрузка ВЭБ составила соответственно 18 [5; 139] против 2 [1; 3] копий/10⁵ клеток ($p < 0,001$). Показано, что группа ВИЧ(+) пациентов неоднородна по частоте выявления и вирусной нагрузке ВЭБ. Наиболее высокие значения частоты (86,7±6,2%) и концентрации ДНК ВЭБ (121 [34; 252] копий/10⁵ клеток) отмечались в группе «наивных» пациентов с тяжелым иммунодефицитом. Среди «опытных» пациентов, получавших терапию, относительный риск выявления ДНК ВЭБ при низкой приверженности был значительно выше по сравнению с теми, у кого сформировалась высокая приверженность (ОР 1,69 (95% ДИ: 1,28–2,24), $p < 0,05$). При достижении неопределяемого уровня вирусной нагрузки ВИЧ концентрация ДНК ВЭБ была существенно ниже, чем в случаях, когда РНК ВИЧ определялась (1[0; 8] против 15 [1; 162] копии/10⁵ клеток, $p < 0,001$). Обнаружение ДНК ВЭБ сопряжено с более высоким уровнем вирусной нагрузки ВИЧ и низким содержанием CD4⁺ Т-лимфоцитов по сравнению с теми пациентами, у кого ДНК ВЭБ не выявлялась. Установлена взаимосвязь между количеством CD4⁺ Т-лимфоцитов у ВИЧ(+) пациентов и вероятностью активной ВЭБ-инфекции. Определено пороговое значение 200 клеток/мкл. Количество CD4⁺ Т-лимфоцитов < 200 клеток/мкл ассоциировано с повышенным в 3,3 раза риском выявления активной ВЭБ-инфекции по сравнению с пациентами, у которых количество CD4⁺ Т-лимфоцитов ≥ 200 клеток/мкл (ОР 3,3 (95% ДИ: 2,4–4,7), $p < 0,001$). Таким образом, впервые в России проведена количественная оценка ВЭБ у ВИЧ-инфицированных пациентов в разрезе разных клинических стадий ВИЧ-инфекции, степени

Адрес для переписки:

Попкова Мария Игоревна
603950, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (831) 469-79-46 (раб.), 8 906 352-60-15 (моб.).
Факс: 8 (831) 469-79-20. E-mail: popmarig@mail.ru

Contacts:

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

Для цитирования:

Попкова М.И., Филатова Е.Н., Минаева С.В., Неумоина Н.В.,
Перфилова К.М., Уткин О.В. Количественная характеристика вируса
Эпштейна–Барр в лейкоцитах крови у взрослых ВИЧ-инфицированных
пациентов // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 351–364.
doi: 10.15789/2220-7619-QAB-17553

Citation:

Popkova M.I., Filatova E.N., Minaeva S.V., Neumoina N.V., Perfilova K.M.,
Utkin O.V. Quantitatively assessed blood leukocyte Epstein–Barr virus
in adult HIV-infected patients // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 351–364. doi: 10.15789/2220-
7619-QAB-17553

© Попкова М.И. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-QAB-17553>

иммунных нарушений, применения и приверженности терапии. Необходимо продолжать междисциплинарные исследования для совершенствования ранней диагностики ВЭБ-ассоциированных заболеваний у ВИЧ-инфицированных.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, ВИЧ-инфекция, ДНК ВЭБ, РНК ВИЧ, CD4⁺ Т-лимфоциты, приверженность АРТ, ПЦР.

QUANTITATIVELY ASSESSED BLOOD LEUKOCYTE EPSTEIN–BARR VIRUS IN ADULT HIV-INFECTED PATIENTS

Popkova M.I.^a, Filatova E.N.^a, Minaeva S.V.^b, Neumoina N.V.^a, Perfilova K.M.^a, Utkin O.V.^a

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

^b Privolzhskiy Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Coinfection with the human immunodeficiency virus (HIV) and Epstein–Barr virus (EBV) represents a current biomedical problem. The purpose of the study was to evaluate blood leukocyte EBV detection rate and viral load in adult HIV-infected patients. *Materials and methods.* There were examined blood leukocytes collected from 138 HIV(+) and 68 HIV(–) individuals aged 20–69 years. Statistical analysis was carried out differentiated according to the stages of HIV infection, the CD4⁺ T-lymphocyte count, and adherence to antiretroviral therapy. *Results.* It was shown that EBV DNA was detected significantly more often in HIV(+) vs HIV(–) individuals (70.3±3.9% and 48.5±6.1%, $p = 0.008$), with EBV viral load comprising 18 [5; 139] versus 2 [1; 3] copies/10⁵ cells ($p < 0.001$), respectively. It has been shown that the group of HIV(+) patients is heterogeneous in the frequency of EBV detection and viral load, with the peak EBV frequency (86.7±6.2%) and DNA (121 [34; 252] copies/10⁵ cells) level observed in “naive” patients with severe immunodeficiency. Among “experienced” patients receiving therapy, the relative risk of detecting EBV DNA with low treatment adherence was significantly higher compared to those who developed high adherence ($p < 0.05$). When the HIV viral load reached undetectable level, EBV DNA concentration was significantly lower where HIV RNA was detectable (1 [0; 8] versus 15 [1; 162] copies/10⁵ cells, $p < 0.001$). Detection of EBV DNA is associated with higher HIV viral load level and lower CD4⁺ T-lymphocyte count compared to patients with undetected EBV DNA. A relationship has been established between the CD4⁺ T-lymphocyte count in HIV(+) patients and the likelihood of active EBV infection. A threshold cut-off of 200 cells/μl was determined. CD4⁺ T-lymphocyte count < 200 cells/μl vs ≥ 200 cells/μl ($p < 0.001$) is associated with a 3.3-fold higher risk of detecting active EBV infection. *Conclusion.* It is necessary to continue interdisciplinary research to improve early diagnostics of EBV-associated diseases in HIV-infected individuals.

Key words: Epstein–Barr virus, HIV infection, EBV DNA, HIV RNA, CD4⁺ T lymphocytes, ART adherence, PCR.

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) — лимфотропные вирусы, которые поражают преимущественно В-клетки и CD4⁺ Т-клетки соответственно. Оба вируса убиквитарны, характеризуются всеобщей восприимчивостью населения и пожизненной персистенцией в организме человека. Специфические средства профилактики до сих пор отсутствуют, а терапевтические стратегии не позволяют полностью элиминировать эти вирусы [12, 21].

Коинфицирование ВЭБ и ВИЧ является актуальной медико-биологической проблемой. Более 90% населения мира во взрослом возрасте являются серопозитивными к ВЭБ [5, 41, 49]. Большинство взрослых людей, которые заражаются ВИЧ, уже инфицированы ВЭБ [12, 21, 50]. К началу 2022 г. распространенность ВИЧ среди взрослого населения в возрасте от 15 до 49 лет во всем мире достигла 0,7% [24], в России — 1,42% [6], для сравнения, в Китае — 0,05% [49]. Россия относится к тем странам,

в которых темпы увеличения случаев новых заражений ВИЧ-инфекцией и числа смертей, связанных с ВИЧ, велики [11].

На протяжении 40-летнего периода от начала эпидемии ВИЧ-инфекции наиболее широко в работах как зарубежных, так и российских исследователей изучались преимущественно вопросы реактивации ВЭБ-инфекции, взаимного влияния ВЭБ и ВИЧ друг на друга в контексте прогрессирования ВИЧ-инфекции, а также патогенеза ассоциированных с ними злокачественных новообразований [9, 11, 12, 18, 21, 29, 45, 47]. В то время как клинико-эпидемиологические особенности ВЭБ-инфекции у лиц с ВИЧ-инфекцией остаются недостаточно изученными.

По данным литературы у ВИЧ-инфицированных ВЭБ является возбудителем, наиболее часто выявляемым в самых разных биосубстратах и в широком диапазоне концентраций [13, 33, 39, 50]. ВЭБ, обнаруживаемый в периферической крови ВИЧ-инфицированных пациентов, преимущественно ассоциирован с моноклеарными клетками перифериче-

ской крови (МНПК) и в плазме крови выявляется редко [20, 40]. Частота обнаружения ДНК ВЭБ у ВИЧ-инфицированных в МНПК по данным разных исследователей существенно различается, варьируя от 6,7% [43] до 78,8% [36]. Вирусная нагрузка ВЭБ в МНПК у взрослых лиц быстро увеличивается после сероконверсии ВИЧ и остается на высоком уровне в течение многих лет [37]. Во всем мире исследования, направленные на количественную оценку выявления ДНК ВЭБ у ВИЧ-инфицированных, не носят систематический характер, а имеющиеся в литературе данные представляют собой разрозненную информацию, полученную на основе использования разных лабораторных протоколов, обследования разнородных групп пациентов и ограниченного набора клинико-лабораторных признаков [13, 34, 46, 50]. В РФ изучению данного вопроса посвящены единичные публикации [13].

Цель исследования — оценить частоту выявления и вирусную нагрузку ВЭБ в лейкоцитах крови у взрослых ВИЧ-инфицированных пациентов.

Материалы и методы

Проведено комплексное клинико-лабораторное обследование 138 ВИЧ-инфицированных пациентов в возрасте 20–69 лет, которые находились на диспансерном наблюдении в ГБУЗ НО «НОЦ СПИД» (г. Нижний Новгород), и 68 ВИЧ-неинфицированных лиц сопоставимого пола и возраста без клинических признаков инфекционной патологии, проходивших диспансеризацию в ООО «НИКА СПРИНГ НН» (г. Нижний Новгород).

Соблюдение этических требований. Работа проводилась с деперсонализированными данными пациентов. Информированное согласие пациентов на проведение исследовательской работы в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013) было получено лечащими врачами медицинских организаций. Работа получила одобрение на заседании локального этического комитета ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (Протокол № 3 от 11.11.2021 г.).

Группы сравнения. Сформированы группы сравнения:

1. ВИЧ-инфицированные пациенты (ВИЧ(+), $n = 138$) и ВИЧ-отрицательные лица (ВИЧ(–), $n = 68$);

2. ВИЧ(+) пациенты по клиническим стадиям ВИЧ-инфекции на основе действующей в РФ классификации [3]: стадия 3 (C_3 , $n = 64$),

стадия 4 (C_4 , $n = 74$), в том числе 4А (C_{4A} , $n = 46$), 4Б (C_{4B} , $n = 9$) и 4В (C_{4B} , $n = 19$);

3. ВИЧ(+) пациенты на основе комбинации данных о степени иммунных нарушений (на основе классификации ВОЗ [48]) и антиретровирусной терапии (АРТ): «наивные» пациенты (без АРТ), $CD4^+$ Т-лимфоциты < 200 клеток/мкл ($G1$, $n = 30$); «наивные» пациенты (без АРТ), $CD4^+$ Т-лимфоциты > 500 клеток/мкл ($G2$, $n = 20$); «опытные» пациенты (получающие АРТ в среднем 36 месяцев), $CD4^+$ Т-лимфоциты < 200 клеток/мкл ($G3$, $n = 43$); «опытные» пациенты (получающие АРТ в среднем 36 мес.), $CD4^+$ Т-лимфоциты > 500 клеток/мкл ($G4$, $n = 45$).

4. ВИЧ(+) пациенты, получающие АРТ ($n = 88$), по схемам терапии: 2 НИОТ+ННИОТ (А, $n = 41$), 2 НИОТ+ИП (В, $n = 27$), 2 НИОТ+ИИ (С, $n = 14$), ИП+ИИ (D, $n = 6$)¹.

5. ВИЧ(+) пациенты, получающие АРТ ($n = 88$), по степени приверженности: высокая (Н, $n = 55$), средняя (М, $n = 5$), низкая (L, $n = 28$).

Анализ клинико-лабораторных показателей каждого пациента (клинические стадии, схемы АРТ и приверженность терапии, результаты ИФА, иммуноблоттинга и ПЦР для определения маркеров ВИЧ-инфекции) проведен ретроспективно на основе данных медицинской документации. Для количественной оценки $CD4^+$ Т-лимфоцитов использовали проточный цитофлуориметр BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Вирусную нагрузку ВИЧ определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с помощью тест-системы «РеалБест РНК ВИЧ количественный» (АО «ВекторБест», Россия). Рекомендуемый производителем тест-системы порог определяемой вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови составляет 58 копий/мл.

ПЦР-исследования для детекции ДНК ВЭБ проводились в лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора. Всем здоровым участникам исследования также было выполнено количественное определение абсолютного и относительного числа $CD4^+$ Т-лимфоцитов на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием набора реагентов «BD Multitest™ 6-color TBNK» (BD Biosciences, США).

Материал для исследования. Материалом для исследования послужила цельная периферическая кровь, стабилизированная КЗЭДТА. Для получения фракции лейкоцитов крови использовали реагент «Гемолитик» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

¹ НИОТ — нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ННИОТ — ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ИП — ингибиторы протеазы, ИИ — ингибиторы интегразы.

Количественное определение ДНК ВЭБ. Выделение тотальной нуклеиновой кислоты из лейкоцитов крови проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Выявление и количественное определение ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови выполняли методом ПЦР-РВ с применением коммерческого набора «АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) на амплификаторе Rotor-Gene Q 5plex HRM (Qiagen, Германия). Лабораторный протокол на всех этапах ПЦР соблюдали согласно инструкции производителя.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка данных проводилась с использованием языка программирования R версия 2022.12.0+353 (The R Foundation for Statistical Computing, Inc.)² и среды RStudio версия 2022.12.0+353 (RStudio, PBC)³. Принадлежность выборок к нормальному распределению определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка и графиков квантилей. Для попарного сравнения независимых выборок использован критерий Манна–Уитни и коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s). Количество ДНК, РНК и клеток представляли в виде $Me [Q1; Q3]$ (где Me — медиана, $Q1$, $Q3$ — первый и третий квартили). Долю описывали с указанием стандартного отклонения процентной доли ($P \pm \sigma_p$, %). Оценку различий относительных показателей в анализируемых группах проводили с применением критерия χ^2 (хи-квадрат) с поправкой Йетса и критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Оценку возможного влияния ВИЧ-инфекции на активность ВЭБ-инфекции проводили с использованием метода главных компонент (РСА-анализ). Анализировали распределение ВИЧ(+) пациентов в координатах первых двух главных компонент в зависимости от вирусной нагрузки ВИЧ, содержания $CD4^+$ Т-лимфоцитов и приверженности пациентов АРТ. При этом приверженность терапии выражали в числовых значениях от 0 до 1, где 0 — без АРТ, 1 — высокая приверженность АРТ. Для оценки вклада исследуемых переменных в состав компонент рассчитывали их корреляцию — косинус угла между вектором переменной и осью компоненты. Возможные факторы группировки пациентов в координатах двух первых измерений выявляли методом визуального наложения.

Для оценки возможности применения показателей вирусной нагрузки ВИЧ и содержания $CD4^+$ Т-лимфоцитов в качестве скрининговых

лабораторных критериев отнесения ВИЧ(+) пациентов в группу риска активной ВЭБ-инфекции строили логит-модель зависимости выявления активной ВЭБ-инфекции от вирусной нагрузки ВИЧ и абсолютного количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов. ВЭБ-инфекцию считали активной, если вирусная нагрузка ВЭБ превышала установленный на основе описанной нами ранее методологии пороговый уровень ≥ 29 копий/ 10^5 клеток [7]. Для оценки стабильности модели, воспроизводимости результата применяли метод кросс-валидации. Оценку качества модели производили на основании показателей AUC и коэффициента R^2 МакФаддена (AUC $\geq 0,750$ и $R^2 \geq 0,200$). Для определения порогового значения количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов, соответствующего активной ВЭБ-инфекции, рассчитывали значение индекса Юдена построенной ROC-кривой отношения специфичности и чувствительности теста. Затем всех исследуемых лиц объединяли в две группы: с низким содержанием $CD4^+$ Т-лимфоцитов (ниже порогового) и с высоким (равным или выше порогового). Рассчитывали отношение рисков (ОР) выявления активной ВЭБ-инфекции у лиц с содержанием $CD4^+$ Т-лимфоцитов ниже и выше выявленного порога. В расчетах применяли метод максимального правдоподобия и метод Вальда.

Результаты

Частота обнаружения и концентрация ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови ВИЧ(+) и ВИЧ(–) взрослых лиц

На основе метода ПЦР-РВ установлено, что ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови ВИЧ(+) пациентов выявляли чаще и в более высокой концентрации, чем среди ВИЧ(–) лиц (табл. 1). Рассчитанный относительный риск выявления ДНК ВЭБ в группе ВИЧ(+) был в 1,4 раза выше по сравнению с группой ВИЧ(–) (ОР 1,37 (95% ДИ: 1,09–1,72), $p = 0,008$). Вирусная нагрузка ВЭБ в группе ВИЧ(+) варьировала в широком диапазоне — от недетектируемого уровня до 11137 копий/ 10^5 клеток, а по сравнению с группой ВИЧ(–) в среднем была выше на 14 (95% ДИ: 7–43) копий/ 10^5 клеток ($p < 0,001$).

Неоднородность группы ВИЧ(+) пациентов по частоте выявления и концентрации ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови

На основе дифференциального анализа в группе ВИЧ(+) пациентов установлены различия по частоте выявления и концентрации ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови. При оценке полученных результатов по стадиям ВИЧ-инфекции показано, что в группе C_3 частота обнаружения ДНК

² URL: <https://www.R-project.org>

³ URL: <http://www.rstudio.com>

ВЭБ была одинаковой по сравнению с группой ВИЧ(–), но вирусная нагрузка отличалась более высокими значениями ($p = 0,003$) (табл. 1). Как общая тенденция, в группах C_4 (C_{4A} , C_{4B} , C_{4C}) относительно группы C_3 резко возросла частота выявления и концентрация ДНК ВЭБ ($p < 0,001$ и $p = 0,023$ соответственно). При этом между группами C_{4A} , C_{4B} и C_{4C} статистически значимые различия выявлены не были. Дополнительно проведенный анализ данных по стадиям ВИЧ-инфекции с учетом проводимой АРТ позволил уточнить, что наиболее высокие значения вирусной нагрузки ВЭБ наблюдались в группе C_4 у пациентов без АРТ. Средняя концентрация ДНК ВЭБ у них была в 3,0 раза выше по сравнению с пациентами этой же группы, получавших АРТ ($p = 0,043$), и в 4,0 раза выше, чем у пациентов в группе C_3 без АРТ ($p < 0,001$).

Примененный нами подход разделения ВИЧ(+) пациентов на группы G1–G4 позво-

лил выявить следующие закономерности. Наименьшая частота выявления ДНК ВЭБ, близкая по своим значениям к группе ВИЧ(–), отмечалась в группе G4 (табл. 1). Наиболее высокая частота обнаружения и вирусная нагрузка ВЭБ были выявлены в группе G1. Рассчитанный относительный риск выявления ДНК ВЭБ в этой группе был в 3,5 раза выше, чем у ВИЧ(–) лиц (ОР 3,53 (95% ДИ: 1,33–9,32), $p = 0,003$). Для сравнения, в совокупной группе ВИЧ(+) ОР составил 1,37. Между группами G1 и G3, а также G2 и G4 по частоте обнаружения и вирусной нагрузке ВЭБ статистически значимые различия не выявлены.

Дана оценка влияния АРТ на количественные показатели ВЭБ (табл. 1). Установлено, что применение той или иной схемы АРТ существенно не отражалось на обнаружении и концентрации ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови ВИЧ-инфицированных. Выявление вирусной

Таблица 1. Сравнительная характеристика частоты выявления и концентрации ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови ВИЧ(–) и ВИЧ(+) взрослых лиц

Table 1. Comparative characteristics for EBV DNA detection and viral load in blood leukocytes of HIV(–) and HIV(+) adults

Группа сравнения Comparison group	Исследовано проб Samples examined			
	Всего Total	из них ДНК ВЭБ(+) including EBV DNA(+)		
		n	n	$P \pm \sigma_p, \%$
ВИЧ(–) HIV(–)	68	33	48,5±6,1	2 [1; 3]
ВИЧ(+) HIV(+)	138	97	70,3±3,9 ^{^^}	18 [5; 139] [^]
в том числе: including:				
C₃	64	33	51,6±6,3	9 [2; 24] ^{^^}
C₄	74	62	83,8±4,3 ^{^*}	36 [6; 173] ^{^^**}
C_{4A}/C_{4A}	46	38	82,6±5,6 ^{^*}	35 [7; 196] ^{^^**}
C_{4B}/C_{4B}	9	8	88,9±10,5 ^{^^*}	36 [6; 173] ^{^^**}
C_{4C}/C_{4C}	19	16	84,2±8,4 ^{^^*}	49 [5; 115] ^{^^**}
G1	30	26	86,7±6,2 ^{^^}	121 [34; 252] [^]
G2	20	14	70,0±10,3	6 [1; 9] [#]
G3	43	35	81,4±5,9 ^{^^}	54 [8; 212] [^]
G4	45	22	48,9±7,4 [#]	9 [2; 14] ^{^^#}
A	41	27	65,9±7,4	22 [6; 167] [^]
B	27	21	77,8±8,2 ^{^^}	14 [6; 147] [^]
C	14	7	50,0±13,9	6 [3; 30] ^{^^}
D	6	2	33,3±21,1	12 [7; 17]
H	55	29	52,7±7,4	6 [2; 22] ^{^^}
M	5	3	60,0±21,9	14 [14; 75] ^{^^}
L	28	25	89,3±5,9 ^{^^**}	54 [14; 224] ^{^^**}

Примечание. [^] – $p < 0,001$ (относительно группы ВИЧ(–)); ^{^^} – $p < 0,01$ (относительно группы ВИЧ(–)); ^{*} – $p < 0,001$ (относительно группы C_3); ^{**} – $p < 0,01$ (относительно группы C_3); [#] – $p < 0,01$ (относительно групп G1 и G3); ^{**} – $p < 0,001$ (относительно группы H).
Note. [^] – $p < 0,001$ (relative to group HIV(–)); ^{^^} – $p < 0,01$ (relative to group HIV(–)); ^{*} – $p < 0,001$ (relative to group C_3); ^{**} – $p < 0,01$ (relative to group C_3); [#] – $p < 0,01$ (relative to groups G1 and G3); ^{**} – $p < 0,001$ (relative to group H).

Таблица 2. Сравнительная характеристика показателей ВИЧ-инфекции в зависимости от выявления ДНК ВЭБ

Table 2. Comparative characteristics of HIV infection indicators depending on EBV DNA detection

Группа Group	n	CD4 ⁺		РНК ВИЧ HIV RNA
		отн., % rel., %	абс. клеток/мкл abs., cells/ μ l	копии/мл copies/ml
ВЭБ(+)/ВИЧ(+) EBV(+)/HIV(+)	97	13,1 [6,9; 30,9]	160 [80; 556]	7600 [58; 260 000]
ВЭБ(-)/ВИЧ(+) EBV(-)/HIV(+)	41	29,3 [16,7; 37,6]	589 [223; 778]	58 [58; 1200]
Δ (95% ДИ) Δ (95% CI)		-10,3 (-16,5-3,9)	-255 (-411-90)	3242 (131-27 942)
Уровень значимости различий (p) p-value		0,002	0,001	< 0,001

ДНК было обусловлено, главным образом, приверженностью терапии. Относительный риск выявления ДНК ВЭБ в группе L по сравнению с группой H был выше в 1,7 раза (ОР 1,69 (95% ДИ: 1,28–2,24), $p < 0,05$).

Последующая дифференциальная оценка частоты обнаружения и вирусной нагрузки ВЭБ у лиц, получающих АРТ, позволила выявить разные профили пациентов в группах G3 и G4 в зависимости от приверженности терапии. Так, в группе G4 вирусная нагрузка ВЭБ при низкой приверженности терапии статистически значимо превышала уровень у пациентов этой же группы с высокой приверженностью на 11 (95% ДИ: 2–20) копий/ 10^5 клеток ($p = 0,022$) и даже соответствующей группы G2 (без АРТ) на 9 (95% ДИ: 2–19) копий/ 10^5 клеток ($p = 0,022$). Частота обнаружения ДНК ВЭБ в группах G2, G4 с низкой приверженностью и G4 с высокой приверженностью АРТ составила соответственно 70,0 \pm 10,3%, 77,0 \pm 13,7% и 41,8 \pm 8,2% (статистически незначимые различия).

Аналогичные тенденции отмечались и в группе G3, когда при низкой приверженности АРТ наблюдались наиболее высокие значения вирусной нагрузки ВЭБ (123 [8; 234] копии/ 10^5 клеток) по сравнению с теми пациентами этой же группы, у кого приверженность была высокой (19 [2; 187] копии/ 10^5 клеток) и даже по сравнению с соответствующей группой G1 (без АРТ) (55 [7; 186] копии/ 10^5 клеток). При этом частота обнаружения ДНК ВЭБ у них была одинаковой (87,5 \pm 6,8, 81,4 \pm 5,9, 86,7 \pm 6,2% соответственно).

На основе разработанной нами ранее методологии [7], установлено пороговое значение вирусной нагрузки ВЭБ (29 копий/ 10^5 клеток или 1,5 lg копий/ 10^5 клеток), которое может служить лабораторным критерием дифференциальной оценки активной и латентной формы ВЭБ-инфекции. В данном исследовании вирусная нагрузка ВЭБ ≥ 29 копий/ 10^5 клеток выявлялась у 30,4 \pm 3,9% от общего числа пациентов

в группе ВИЧ(+). При этом уровни, превышающие пороговое значение ДНК ВЭБ, чаще выявляли среди пациентов группы C₄ по сравнению с C₃ (50,0 \pm 5,9% против 14,1 \pm 4,4%, $p < 0,001$). Как общая тенденция, их доля увеличивалась от стадии 4а (43,5 \pm 7,4%) к 4в (70,0 \pm 10,5%) ($p = 0,087$). Вирусная нагрузка ВЭБ превышала 29 копий/ 10^5 клеток у основной части группы G1 (70,0 \pm 8,5%) и у половины группы G3 (44,2 \pm 7,7%) ($p = 0,030$). В то время как в группах G2 и G4 такие случаи встречались редко (5,0 \pm 5,0% и 4,4 \pm 3,1% соответственно), характеризуя тем самым преимущественно латентную форму течения ВЭБ-инфекции. Значительные различия вирусной нагрузки ВЭБ ≥ 29 копий/ 10^5 клеток наблюдались между группами H и L (10,9 \pm 4,2% и 50,0 \pm 9,6% соответственно, $p < 0,001$).

Характеристика клинико-лабораторных показателей ВИЧ-инфекции при обнаружении ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови пациентов

На следующем этапе исследования выполнен сравнительный анализ лабораторных показателей ВИЧ-инфекции и проводимой АРТ между пациентами, у которых ДНК ВЭБ была обнаружена или не обнаружена — ВЭБ(+)/ВИЧ(+) и ВЭБ(-)/ВИЧ(+) соответственно. Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют, что при обнаружении ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови отмечается более высокий уровень вирусной нагрузки ВИЧ и низкое содержание CD4⁺ Т-лимфоцитов по сравнению с теми пациентами, у кого ДНК ВЭБ не выявлялась. Различия по возрасту и полу пациентов между группами не выявлены.

ДНК ВЭБ чаще обнаруживали при определенном уровне вирусной нагрузки ВИЧ, чем при достижении неопределяемого уровня (то есть 58 копий/мл и ниже) (76,9 \pm 6,8% против 55,1 \pm 7,1% соответственно, $p = 0,057$). При этом вирусная нагрузка ВЭБ различалась наиболее значительно (15 [1; 162] против 1 [0; 8] копии/ 10^5 клеток, $p < 0,001$).

По результатам корреляционного анализа у ВЭБ(+)/ВИЧ(+) пациентов установлено наличие прямой связи вирусной нагрузки ВЭБ и ВИЧ ($r_s = +0,39$, $p < 0,001$), а также обратной связи вирусной нагрузки ВЭБ и абсолютного/относительного количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов ($r_s = -0,57/r_s = -0,52$ соответственно, $p < 0,001$). При этом отметим, что статистически значимая связь количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов с вирусной нагрузкой ВИЧ наблюдалась только в группе ВЭБ(+)/ВИЧ(+) ($r_s = -0,46$, $p < 0,001$).

Последующий PCA-анализ позволил охарактеризовать зависимость между исследуемыми показателями. При анализе всех ВИЧ(+) пациентов удалось установить их распределение в координатах двух первых компонент, суммарно объяснявших 79,96% дисперсии. Выявлено, что в отношении первой компоненты вклад вирусной нагрузки ВИЧ равноценен, но противопоставлен вкладу содержания $CD4^+$ Т-лимфоцитов и приверженности АРТ. Отметим, что параметр содержания $CD4^+$ Т-лимфоцитов вносил сопоставимый вклад в формирование как первой, так и второй главных компонент. Для оценки возможного влияния исследованных переменных на ВЭБ-инфекцию провели графический анализ распределения ВИЧ(+) пациентов в координатах двух первых компонент в зависимости от вирусной нагрузки ВЭБ (рис. 1).

На графике барицентры двух групп располагались на выраженном удалении друг от друга во втором и четвертом квадрантах. Кроме того, все исследованные нами переменные оказывали влияние на риск повышенной вирусной нагрузки ВЭБ. Исходя из этого можно предположить, что у пациентов с низкой приверженностью АРТ (или без АРТ), низким содержанием $CD4^+$ клеток и/или высокой вирусной нагрузкой ВИЧ риск выявления ДНК ВЭБ $\geq 1,5$ lg копий/ 10^5 клеток (или ≥ 29 копий/ 10^5 клеток), а, следовательно, активной ВЭБ-инфекции возрастал, и наоборот.

Проведена оценка возможности применения показателей вирусной нагрузки ВИЧ и количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов в качестве скрининговых лабораторных критериев отнесения пациентов в группу риска активной ВЭБ-инфекции. При тестировании вирусной нагрузки ВИЧ статистически значимых коэффициентов получить не удалось, поэтому была построена модель зависимости вероятности активной ВЭБ-инфекции только от количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов. Результаты кросс-валидации показали, что из 100 построенных моделей ни для одной показатель AUC не был ниже 0,750. Полученная медиана значений AUC 0,850 [0,800; 0,870] свидетельствует о том, что бинарная логистическая модель качественно описывает тестируемую зависимость и обладает хорошей воспроизводимостью результатов.

Для предсказания зависимости вероятности активной ВЭБ-инфекции от количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных построена модель бинарной логистической регрессии. Показатель AUC модели составил 0,829, а значение коэффициента МакФаддена — 0,231, что свидетельствует о высоком качестве модели. Сама модель имела вид:

$$\text{Logit}(p) = \text{LogE} (p/(1-p)) = 0,558 - 0,005 \times [CD4^+],$$

где $[CD4^+]$ — количество $CD4^+$ Т-лимфоцитов (клеток/мкл), p — вероятность выявления активной ВЭБ-инфекции.

Для данной модели построена ROC-кривая и определено пороговое значение вероятности, соответствующее комбинации максимальных значений чувствительности и специфичности модели (рис. 2А). Пороговое значение вероятности составило 0,398, а соответствующие ему значения специфичности и чувствительности — 0,73 и 0,90. При указанных условиях пороговое значение количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов было эквивалентно 200 клеток/мкл. Также

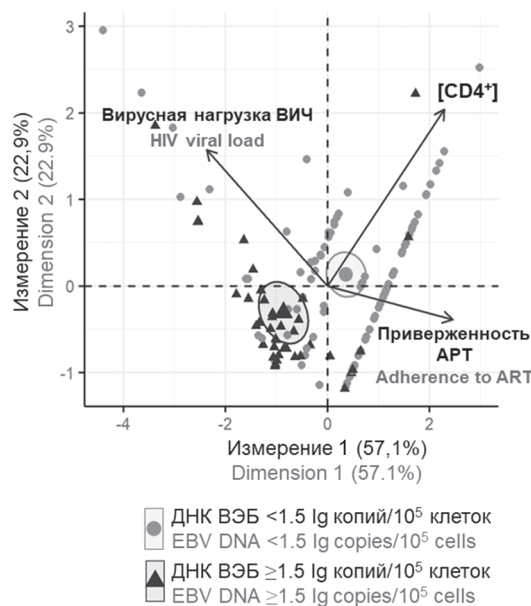


Рисунок 1. Расположение точек ВИЧ(+) пациентов в координатах двух первых главных компонент с визуальным наложением фактора выявления ДНК ВЭБ выше или ниже порогового уровня ($1,5\ lg\ копий/10^5\ клеток$). Эллипс отображает 95%-й доверительный интервал расположения барицентра групп. Стрелками обозначены вектора изученных переменных
Figure 1. Position of HIV(+) patients in the coordinates of the first two principal components with visual overlay of EBV DNA detection factor above or below the threshold level ($1.5\ lg\ copies/10^5\ cells$). The ellipse displays the 95% confidence interval of the barycenter patient group location. The arrows indicate the vectors of the studied variables

были рассчитаны вероятности выявления активной ВЭБ-инфекции в зависимости от количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов (рис. 2Б). При этом уровень ложноположительных результатов составил 27% (26 из 96 случаев латентной ВЭБ-инфекции), ложноотрицательных — 10% (4 из 42 случаев активной ВЭБ-инфекции).

Проведено распределение ВИЧ(+) пациентов в группах активная ВЭБ-инфекция и латентная ВЭБ-инфекция на две категории в зависимости от количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов: с низким количеством (ниже 200 клеток/мкл) и высоким количеством (равным или выше 200 клеток/мкл). Установлено, что в категории лиц с низким количеством $CD4^+$ Т-лимфоцитов доля пациентов из группы активная ВЭБ-инфекция составила 59% (38 из 64 человек), а при высоком количестве — 5% (4 из 74 человек). Различия в частоте выявления активной ВЭБ-инфекции, когда значения вирусной нагрузки ВЭБ у ВИЧ-инфицированных составляли ≥ 29 копий/ 10^5 клеток, были статистически значимыми ($p < 0,001$). Рассчитанный вероятный риск активной ВЭБ-инфекции у ВИЧ-инфицированных при низком количестве $CD4^+$ Т-лимфоцитов был в 3,3 раза выше (95% ДИ: 2,4–4,7), чем у пациентов с высоким содержанием $CD4^+$ Т-лимфоцитов.

Обсуждение

Клинические наблюдения зарубежных и российских специалистов свидетельствуют о том, что у лиц, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), учащаются и продлеваются эпизоды реактивации ВЭБ, что может существенно влиять на показатели заболеваемости и смертности [1, 21]. ВЭБ-инфекция может приводить к развитию хронической активной ВЭБ-инфекции, волосатой лейкоплакии, лимфоидным интерстициальным пневмонитам и широкому спектру злокачественных новообразований (лимфом) у ЛЖВ. Симптомы развиваются независимо от длительности инфицирования ВИЧ и стадии заболевания, а выраженность и тяжесть симптомов ВЭБ-инфекции коррелируют с уровнем $CD4^+$ Т-лимфоцитов [1, 2].

Наше исследование было основано на определении ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови ВИЧ(+) и ВИЧ(–) взрослых. По данным литературы у взрослых доноров крови частота выявления ДНК ВЭБ в МНПК варьировала от 5,1% [42] до 72,0% [25], а у ВИЧ-инфицированных лиц от 6,7% [43] до 78,8% [36]. Однако, обобщив данные разных исследований, становится очевидным, что ДНК ВЭБ в когорте ЛЖВ выявляют значительно чаще, чем в среднем в популяции [14, 16, 17, 31, 39, 50].

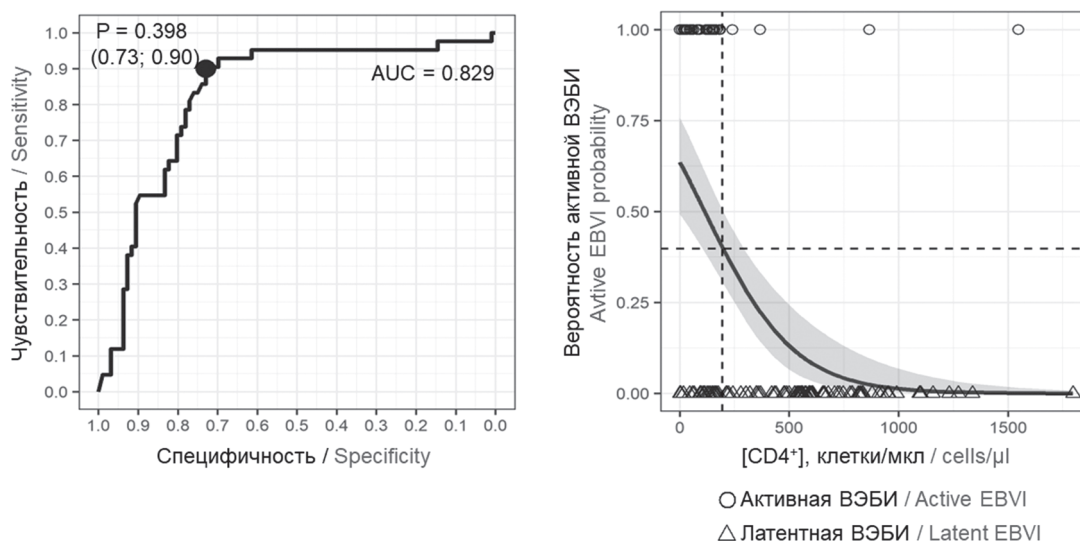


Рисунок 2. Анализ предиктивной силы показателя абсолютного количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов для выявления активной ВЭБ-инфекции

Figure 2. Analysis of the predictive power for absolute $CD4^+$ T cell count to detect active EBV infection

Примечание. А) ROC-анализ. Точкой обозначено пороговое значение вероятности и соответствующие ему значения специфичности и чувствительности. Б) Предсказанные вероятности активной ВЭБИ. Закрашенная область соответствует доверительному интервалу вероятности. Пунктирными линиями обозначено пороговое значение вероятности 0,398 и соответствующее ему пороговое значение количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов (200 клеток/мкл). ВЭБИ — ВЭБ-инфекция.

Note. A) ROC analysis. The dot indicates the threshold probability value and the corresponding specificity and sensitivity levels. B) Predicted probabilities of active EBVI. The shaded area corresponds to probability confidence interval. The dotted lines indicate the probability threshold of 0.398 and the corresponding $CD4^+$ T-lymphocyte count threshold (200 cells/ μ l). EBVI — EBV infection.

По результатам собственных исследований ДНК ВЭБ была выявлена у 70,3% ВИЧ-инфицированных пациентов, медиана вирусной нагрузки составила 18 [5; 139] копий/ 10^5 клеток. Близкие данные ранее были получены в другой работе итальянскими исследователями, при этом частота обнаружения ДНК ВЭБ составила 73,1%, а медиана вирусной нагрузки — 43 [1–151] копии/ 10^5 клеток (указана медиана [межквартильный интервал]) [36]. Полученные результаты подтверждают, что в группе ВИЧ(+) наблюдается значительно более высокая частота выявления и концентрация ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови по сравнению с ВИЧ(–) лицами [20, 21, 36].

В свою очередь наши наблюдения, а также ряд зарубежных исследований свидетельствуют о том, что группа ВИЧ(+) является неоднородной по частоте выявления и вирусной нагрузке ВЭБ [20, 23, 36, 43]. Отметим, что сравнительный анализ литературных данных существенно затрудняют используемые исследователями разные методологические стратегии при формировании групп исследования, анализируемые биосубстраты (слюна, плазма крови, МНПК, биоптаты опухолей) и отсутствие стандартизации количественной ПЦР [13, 34, 46, 50]. Именно поэтому мы планировали и проводили наше исследование комплексно с учетом как российской клинической классификации [3], так и классификации ВОЗ по степени выраженности иммунных нарушений на основе количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов [48], а также применения и приверженности АРТ.

По материалам одной из публикаций российских авторов у ВИЧ-инфицированных пациентов, из которых основная часть случаев (75,5%) приходилась на стадию 4В, при исследовании цельной крови ДНК ВЭБ была обнаружена в 25,6% случаев, а вирусная нагрузка варьировала от 1,0 до 3,3 lg копий/ 10^5 клеток [13]. Для сравнения, в нашем исследовании в данной группе пациентов ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови выявляли с частотой 84,2%, а разброс концентраций составил от 2 до 362 копии/ 10^5 клеток (или 0,2–2,6 lg копий/ 10^5 клеток). Выполненный нами сравнительный анализ по клиническим стадиям российской классификации позволил расширить представления о характере ВЭБ-инфекции у ЛЖВ. Как общая закономерность, наиболее высокие показатели определения ДНК ВЭБ были нами выявлены у пациентов с более тяжелым течением ВИЧ-инфекции на 4 стадии заболевания по сравнению с теми, у кого была диагностирована 3 стадия. При этом от стадии 3 к стадии 4В наблюдалось увеличение случаев с клинически значимыми уровнями ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови (выше 29 копий/ 10^5 клеток или 1,5 lg

копий ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток) — 14,1% против 70,0%, что отражает тенденцию к повышению репликативной активности ВЭБ на фоне прогрессирования ВИЧ-инфекции [20].

Между тем разделение пациентов по клиническим стадиям ВИЧ-инфекции дает общее представление о течении ВЭБ-инфекции у ЛЖВ и, к сожалению, не позволяет исследователю оценить основные факторы, которые могут влиять на частоту обнаружения и вирусную нагрузку ВЭБ при коинфицировании ВИЧ, а именно количество $CD4^+$ Т-лимфоцитов и вирусную нагрузку ВИЧ, а также их особенности в зависимости от проводимой АРТ и степени приверженности терапии. Выявленные нами особенности рекомендуется учитывать при планировании дальнейших исследований, посвященных изучению коинфекции ВЭБ и ВИЧ.

Полученный профиль ВИЧ(+) пациентов с обнаруживаемой вирусной нагрузкой ВЭБ соответствует тому, что встречается в большинстве работ зарубежных авторов: ДНК ВЭБ выявляли у пациентов с более высокой вирусной нагрузкой ВИЧ и более низким количеством $CD4^+$ Т-лимфоцитов [23, 30, 36, 38, 50]. В некоторых публикациях встречаются противоречащие данные, согласно которым корреляция между вирусной нагрузкой ВЭБ и вирусной нагрузкой ВИЧ или количеством $CD4^+$ Т-лимфоцитов не была обнаружена [19, 26, 40]. Совсем исключительным представляется вариант, когда на основе оценки вирусной нагрузки ВЭБ в плазме крови ВИЧ-инфицированных наблюдалась положительная корреляция с количеством $CD4^+$ клеток [46].

При естественном течении инфекционного процесса в отсутствие терапии ВИЧ-инфекция приводит к потере иммунологического контроля над ВЭБ-инфекцией (вследствие истощения пула $CD4^+$ клеток) и усилению литической репликации ВЭБ [19, 20, 21]. Это объясняет, почему в нашем исследовании группа G1, представленная «наивными» пациентами с тяжелым иммунодефицитом ($CD4^+$ Т-лимфоциты < 200 клеток/мкл), по сравнению с остальными отличалась самыми высокими показателями частоты обнаружения ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови (86,7%) и вирусной нагрузки ВЭБ (121 [34; 252] копий/ 10^5 клеток). Кроме того, в большинстве случаев (70,0%) концентрация вируса характеризовала активную форму ВЭБ-инфекции. В явном контрасте с ними группа «наивных» ВИЧ-инфицированных, у которых содержание $CD4^+$ Т-лимфоцитов превышало 500 клеток/мкл, продемонстрировали относительно низкие значения вирусной нагрузки ВЭБ (6 [1; 9] копий/ 10^5 клеток), а уровни выше порогового значения были выявлены только у 5,0% пациентов.

Внедрение в 1996 г. в мировую практику антиретровирусной терапии резко изменило естественное течение ВИЧ-инфекции у детей и взрослых [27]. АРТ направлена на медикаментозное подавление репликации ВИЧ и восстановление иммунитета. Однако на течение ВЭБ-инфекции, по данным литературы, АРТ оказывает неоднозначное влияние [23, 36, 44]. По одним сведениям, при эффективной АРТ вирусная нагрузка ВЭБ была ниже, чем в отсутствие терапии или при неэффективной терапии [23, 36]. В других источниках, наоборот, на фоне проводимой АРТ отмечалось повышение вирусной нагрузки ВЭБ в МНПК [26, 40]. Отметим, что в литературе встречаются схожие результаты количественного определения ВЭБ у пациентов при проведении АРТ и без нее [43] или при разной длительности лечения [46].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в общем у ВИЧ(+) пациентов, получавших АРТ, относительный риск выявления ДНК ВЭБ при низкой приверженности терапии был значительно (в 1,7 раза) выше по сравнению с теми, у кого сформировалась высокая приверженность. ДНК ВЭБ обнаруживали чаще при определяемом уровне вирусной нагрузки ВИЧ, чем при достижении неопределяемого уровня. Дифференциальный анализ в разных группах ВИЧ(+) пациентов позволил установить, что вирусная нагрузка ВЭБ у лиц с количеством $CD4^+$ Т-лимфоцитов > 500 клеток/мкл при высокой приверженности АРТ была существенно ниже, достигая недетектируемого уровня. Однако у лиц с количеством $CD4^+$ Т-лимфоцитов < 200 клеток/мкл даже при высокой приверженности АРТ ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови определяли одинаково часто и у 36,7% из них вирусная нагрузка характеризовала активную ВЭБ-инфекцию. Снижение влияния АРТ на ВЭБ-инфекцию в данном случае, может быть обусловлено выраженным нарушением общего иммунного надзора за ВЭБ-инфекцией в этой группе пациентов [36].

Более того, у пациентов с низкой приверженностью АРТ по сравнению с высоко приверженными или «наивными» пациентами без АРТ мы наблюдали даже более высокую вирусную нагрузку ВЭБ. Ранее были предложены две теории повышения вирусной нагрузки ВЭБ после начала АРТ [35]. Но если подобные наблюдения до сих пор были описаны в литературе только в отношении лиц с тяжелым иммунодефицитом [26, 35, 36], то в нашем исследовании аналогичные, причем статистически значимые различия, были получены и для лиц с количеством $CD4^+$ Т-лимфоцитов > 500 клеток/мкл.

На основе полученных в настоящем исследовании данных о повышенной репликативной активности ВЭБ у ВИЧ(+) взрослых по сравне-

нию с ВИЧ(-) лицами, к тому же наиболее выраженной у отдельных категорий пациентов, нами впервые был разработан методический подход скрининга активной формы ВЭБ-инфекции. Поскольку в настоящее время в РФ клинический стандарт обследования ВИЧ-инфицированных не включает определение специфических маркеров ВЭБ-инфекции, проведена оценка возможности применения показателей вирусной нагрузки ВИЧ и количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов в качестве скрининговых для отнесения пациентов в группу риска активной ВЭБ-инфекции. В качестве дифференциального лабораторного критерия латентной и активной формы ВЭБ-инфекции был применен установленный нами пороговый уровень вирусной нагрузки ВЭБ (29 копий/ 10^5 клеток или $1,5 \lg$ копий ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток (методология изложена нами ранее [7]). Количественное ПЦР-исследование ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови является особенно актуальным у лиц с иммунодефицитом, поскольку определение только серологических маркеров острой ВЭБ-инфекции у них может быть неэффективным [4, 13].

Как и в ряде других исследований, анализ показал взаимосвязь клинически значимых уровней вирусной нагрузки ВЭБ только с количеством $CD4^+$ Т-лимфоцитов [1, 2, 38]. Установлено пороговое значение абсолютного количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов на уровне 200 клеток/мкл. В диагностическом аспекте данный количественный критерий является приемлемым: чувствительность — 0,90; специфичность — 0,73. В результате предложена диагностическая стратегия, которая может быть рекомендована к применению в лабораторной и клинической практике, а также научно-исследовательской работе для лабораторного скрининга активной ВЭБ-инфекции у ВИЧ-инфицированных пациентов с целью формирования группы риска и дальнейшего углубленного обследования на ВЭБ-ассоциированные заболевания, включая злокачественные новообразования [44]. По данным собственных исследований группу риска составили 30,4% от общего числа ВИЧ(+) пациентов. Отметим, что в группе ВИЧ(-) вирусная нагрузка ВЭБ ни у кого не превышала пороговое значение. Согласно немногочисленным литературным данным, маркеры и клинические симптомы ВЭБ-инфекции (реактивация) выявлялись у 23% лиц с ВИЧ-инфекцией [1].

Подводя итоги, отметим, что выявленная при количественной оценке ВЭБ неоднородность популяции ВИЧ-инфицированных в зависимости от иммунного статуса и приверженности АРТ является методической основой для совершенствования и планирования профилактических и противоэпидемических мероприятий. Кроме того, полученные нами результаты количествен-

ной оценки ДНК ВЭБ у ВИЧ-инфицированных в перспективе имеют важное эпидемиологическое значение в свете имеющихся в литературе данных о том, что высокая вирусная нагрузка ВЭБ в клетках периферической крови ассоциирована с увеличением молекулярно-генетического разнообразия ВИЧ [17, 22]. Также следует отметить, что на фоне ВИЧ-инфекции у пациентов наблюдалась смена штаммов, соответствующих генотипам ВЭБ-1 и ВЭБ-2 [15]. Причинно-следственные связи этих взаимодействий ВЭБ и ВИЧ еще предстоит изучить. Несмотря на успехи АРТ, в клиническом аспекте прогнозы специалистов сводятся к тому, что эпидемический потенциал ВИЧ-инфекции на фоне увеличения продолжительности жизни пациентов будет сопровождаться ростом числа случаев выявления ВЭБ-ассоциированных опухолей, что требует продолжения междисциплинарных исследований в контексте данной проблемы [8, 10, 27, 44, 47, 50].

Заключение

Впервые в РФ проведена количественная оценка ВЭБ у ВИЧ-инфицированных пациентов в разрезе разных клинических стадий ВИЧ-инфекции, степени иммунных нарушений, применения и приверженности АРТ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в лейкоцитах крови взрослых ВИЧ(+) пациентов частота обнаружения ДНК ВЭБ значительно выше по сравнению с ВИЧ(–) лицами (ОР 1,37 (95% ДИ: 1,09–1,72), $p = 0,008$). При этом медиана вирусной нагрузки ВЭБ составила соответственно 18 [5; 139] против 2 [1; 3] копий/ 10^5 клеток ($p < 0,001$).

Показано, что группа ВИЧ(+) пациентов является неоднородной по частоте выявления и вирусной нагрузке ВЭБ. Полученные результаты в контексте разных клинических стадий объективно отражают закономерное повышение репликативной активности ВЭБ на фоне прогрессирования ВИЧ-инфекции. При этом показано, что использование только лишь клинической классификации ВИЧ-инфекции имеет ограниченные возможности в контексте изучения особенностей течения ВЭБ+ВИЧ-коинфекции.

Установлено, что «наивные» ВИЧ(+) пациенты с тяжелым иммунодефицитом ($CD4^+$ Т-лимфоциты < 200 клеток/мкл) отличаются наиболее высокими показателями частоты обнаружения ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови ($86,7 \pm 6,2\%$) и вирусной нагрузки ВЭБ (121 [34; 252] копий/ 10^5 клеток), к тому же в большинстве случаев ($70,0 \pm 8,5\%$) концентрация вируса характеризовала активную форму ВЭБ-инфекции.

Выявлено, что среди «опытных» ВИЧ(+) пациентов, получавших АРТ, относительный риск выявления ДНК ВЭБ при низкой приверженности терапии был значительно выше по сравнению с теми, у кого сформировалась высокая приверженность (ОР 1,69 (95% ДИ: 1,28–2,24), $p < 0,05$). При достижении неопределяемого уровня вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови (≤ 58 копий/мл) концентрация ДНК ВЭБ была существенно ниже, чем в случаях, когда РНК ВИЧ определялась (1 [0; 8] против 15 [1; 162] копий/ 10^5 клеток, $p < 0,001$).

Продемонстрировано, что обнаружение ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови сопряжено с менее благоприятным течением ВИЧ-инфекции, что выражается в более высоком уровне вирусной нагрузки ВИЧ и низком содержании $CD4^+$ Т-лимфоцитов по сравнению с теми пациентами, у кого ДНК ВЭБ не выявлялась.

Впервые установлена взаимосвязь между количеством $CD4^+$ Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных и вероятностью активной ВЭБ-инфекции. Пороговым значением является 200 клеток/мкл. Применение такого порога позволяет достичь высоких значений чувствительности и специфичности (0,90 и 0,73 соответственно).

Количество $CD4^+$ Т-лимфоцитов < 200 клеток/мкл ассоциировано с повышенным в 3,3 раза риском выявления активной ВЭБ-инфекции по сравнению с пациентами, у которых количество $CD4^+$ Т-лимфоцитов ≥ 200 клеток/мкл (ОР 3,3 (95% ДИ: 2,4–4,7), $p < 0,001$).

В целом полученные результаты создают предпосылки для более активного внедрения количественных исследований ДНК ВЭБ в контексте совершенствования ранней диагностики ВЭБ-ассоциированных заболеваний у ВИЧ-инфицированных лиц.

Список литературы/References

1. Давидович Г.М., Карпов И.А. Клиническое течение вирусной инфекции Эпштейн–Барр у пациентов с ВИЧ // Рецепт. 2007. № 4 (54). С. 115–117. [Davidovich G.M., Karpov I.A. Clinical course of Epstein–Barr viral infection in patients with HIV. *Retsept = Recipe*, no. 4, pp. 115–117. (In Russ.)]
2. Денисенко В.Б., Симованьян Э.М. Клинико-иммунологическая характеристика оппортунистических инфекций у детей при естественном течении ВИЧ-инфекции с учетом пути инфицирования // Детские инфекции. 2022. Т. 21, № 2. С. 16–22. [Denisenko V.B., Simovanyan E.M. Clinical and immunological characteristics of opportunistic infections in children with the natural course of HIV infection, taking into account the route of infection. *Detskie infektsii = Children Infections*, 2022, vol. 21, no. 2, pp. 16–22. (In Russ.)] doi: 10.22627/2072-8107-2022-21-2-16-22
3. ВИЧ-инфекция у взрослых: Клинические рекомендации. 2020. 114 с. [HIV infection in adults: Clinical practice guidelines, 2020. 114 p. (In Russ.)]

4. Львов Н.Д., Дудукина Е.А. Ключевые вопросы диагностики Эпштейна–Барр вирусной инфекции // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2013. № 3. С. 24–32. [Lvov N.D., Dudukina E.A. Key issues of current and diagnosis of Epstein–Barr virus infection. *Infeksionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2013, no. 3, pp. 24–32. (In Russ.)]
5. Марданлы С.Г. Инфицированность вирусом Эпштейна–Барр отдельных групп населения Московской области // Клиническая лабораторная диагностика. 2020. Т. 65, № 6. С. 358–361. [Mardanly S.G. Infection with Epstein–Barr virus in certain groups of the population of the Moscow region. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2020, vol. 65, no. 6, pp. 358–361. (In Russ.)] doi: 10.18821/0869-2084-2020-65-6-358-361
6. Покровский В.В., Ладная Н.Н., Соколова Е.В. ВИЧ-инфекция: Информационный бюллетень № 47. М., 2023. 80 с. [Pokrovsky V.V., Ladnaya N.N., Sokolova E.V. HIV Infection: Information bulletin no. 47. Moscow, 2023, 80 p. (In Russ.)]
7. Попкова М.И., Филатова Е.Н., Соболева Е.А., Брызгалова Д.А., Кулова Е.А., Сахарнов Н.А., Уткин О.В. Диагностическое значение количественного определения ДНК вируса Эпштейна–Барр в лейкоцитах крови у детей при инфекционном мононуклеозе // Журнал инфектологии. 2022. Т. 14, № 2. С. 128–137. [Popkova M.I., Filatova E.N., Soboleva E.A., Bryzgalova D.A., Kulova E.A., Sakharnov N.A., Utkin O.V. Diagnostic value of Epstein–Barr virus DNA quantification in blood leukocytes in children with infectious mononucleosis. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2022, vol. 14, no. 2, pp. 128–137. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2022-14-2-128-138
8. Попова М.О., Цыганков И.В., Гудожникова Я.В., Рогачева Ю.А., Волков Н.П., Лепик К.В., Демченкова М.В., Григорьева М.В., Ефиркина А.Ю., Шнейдер Т.В., Копейкина Ю.В., Степанова С.А., Потапенко В.Г., Климович А.В., Медведева Н.В., Колесникова М.А., Поспелова Т.И., Михайлова Н.Б., Байков В.В., Кулагин А.Д. Плазмобластная лимфома у пациентов с ВИЧ-инфекцией: обзор литературы и результаты российского многоцентрового ретроспективного исследования // Клиническая онкогематология. 2022. Т. 15, № 1. С. 28–41. [Popova M.O., Tsygankov I.V., Gudozhnikova Ya.V., Rogacheva Yu.A., Volkov N.P., Lepik K.V., Demchenkova M.V., Grigoreva M.V., Efirkina A.Yu., Shneider T.V., Kopeikina Yu.V., Stepanova S.A., Potapenko V.G., Klimovich A.V., Medvedeva N.V., Kolesnikova M.A., Pospelova T.I., Mikhailova N.B., Baikov V.V., Kulagin A.D. Plasmablastic Lymphoma in HIV-Positive Patients: A Literature Review and Results of a Russian Multi-Center Retrospective Study. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology*, 2022, vol. 15, no. 1, pp. 28–41. (In Russ.)] doi: 10.21320/2500-2139-2022-15-1-28-41
9. Пузырева Л.В., Сафонов А.Д. Инфекции, вызванные вирусом Эпштейна–Барра, у ВИЧ-инфицированных пациентов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. Т. 93, № 6. С. 108–116. [Puzryeva L.V., Safonov A.D. Infections caused by Epstein–Barr virus in HIV-infected patients. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2016, vol. 93, no. 6, pp. 108–116. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2016-6-108-116
10. Рассохин В.В., Некрасова А.В., Михайлова Н.Б. Злокачественные опухоли при ВИЧ-инфекции. Эпидемиология, патогенез, формы опухолей. Часть 1 // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2017. Т. 9, № 1. С. 7–21. [Rassokhin V.V., Nekrasova A.V., Mikhailova N.B. Malignant tumors in HIV patients. Epidemiology, pathogenesis, and variability. Part 1. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2017, vol. 9, no. 1, pp. 7–21. (In Russ.)] doi: 10.22328/2077-9828-2017-9-1-7-21
11. Рассохин В.В., Некрасова А.В., Байков В.В., Ильин Н.В., Виноградова Ю.Н. Эпидемиология, диагностика и лечение ВИЧ-ассоциированных неходжкинских лимфом // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2018. Т. 10, № 3. С. 17–29. [Rassokhin V.V., Nekrasova A.V., Baikov V.V., Ilyin N.V., Vinogradova Yu.N. Epidemiology, diagnosis, and treatment of HIV-associated non-hodgkin lymphomas. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2018, vol. 10, no. 3, pp. 17–29. (In Russ.)] doi: 10.22328/2077-9828-2018-10-3-17-29
12. Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Дидук С.В., Гончарова Е.В., Шербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Структурно-функциональная характеристика онкогена LMP1 у больных с опухолями, ассоциированными и не ассоциированными с вирусом Эпштейна–Барр // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016. № 2. С. 71–75. [Senyuta N.B., Smirnova K.V., Diduk S.V., Goncharova E.V., Shcherbak L.N., Gurtsevitch V.E. Structural and functional characteristics of the LMP1 oncogene in patients with tumors associated and not associated with the Epstein–Barr virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2016, vol. 31, no. 2, pp. 87–93. (In Russ.)] doi: 10.18821/0208-0613-2016-34-2-71-75
13. Шахгильдян В.И., Ядрихинская М.С., Сафонова А.П., Домонова Э.А., Шипулина О.Ю., Альварес-Фигероа М.В., Долгова Е.А., Тишкевич О.А. Структура вторичных заболеваний и современные подходы к их лабораторной диагностике у больных ВИЧ-инфекцией // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2015. № 1. С. 24–30. [Shakhgildyan V.I., Yadrinhinskaya M.S., Safonova A.P., Domonova E.A., Shipulina O.Yu., Alvarres-Figeroa M.V., Dolgova E.A., Tishkevich O.A. Pattern of secondary diseases and current approaches to their laboratory diagnosis in patients with HIV infection. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2015, no. 1, pp. 24–30. (In Russ.)]
14. Boisseau M., Lambotte O., Galicier L., Lerolle N., Marzac C., Aumont C., Coppo P., Fardet L. Epstein–Barr virus viral load in human immunodeficiency virus-positive patients with reactive hemophagocytic syndrome. *Infect. Dis. (Lond.)*, 2015, vol. 47, no. 6, pp. 423–427. doi: 10.3109/00365548.2015.1007475
15. Buisson M., Morand P., Genoulaz O., Bourgeat M.J., Micoud M., Seigneurin J.M. Changes in the dominant Epstein–Barr virus type during human immunodeficiency virus infection. *J. Gen. Virol.*, 1994, vol. 75, no. 2, pp. 431–437. doi: 10.1099/0022-1317-75-2-431
16. Byrne C.M., Johnston C., Orem J., Okuku F., Huang M.L., Rahman H., Wald A., Corey L., Schiffer J.T., Casper C., Coombs D., Gant S. Examining the dynamics of Epstein–Barr virus shedding in the tonsils and the impact of HIV-1 coinfection on daily saliva viral loads. *PLoS Comput. Biol.*, 2021, vol. 17, no. 6: e1009072. doi: 10.1371/journal.pcbi.1009072
17. Chaillon A., Nakazawa M., Rawlings S.A., Curtin G., Caballero G., Scott B., Anderson C., Gianella S. Subclinical Cytomegalovirus and Epstein–Barr virus shedding is associated with increasing HIV DNA molecular diversity in peripheral blood during suppressive antiretroviral therapy. *J. Virol.*, 2020, vol. 94, no. 19: e00927–20. doi: 10.1128/JVI.00927-20

18. Dandachi D., Morón F. Effects of HIV on the Tumor Microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2020, vol. 1263, pp. 45–54. doi: 10.1007/978-3-030-44518-8_4
19. Dehee A., Asselot C., Piolot T., Jacomet C., Rozenbaum W., Vidaud M., Garbarg-Chenon A., Nicolas J.C. Quantification of Epstein–Barr virus load in peripheral blood of human immunodeficiency virus-infected patients using real-time PCR. *J. Med. Virol.*, 2001, vol. 65, no. 3, pp. 543–552.
20. Fellner M.D., Durand K., Correa R.M., Redini L., Yampolsky C., Colobraro A., Sevlever G., Teyssié A.R., Benetucci J., Picconi M.A. Circulating Epstein–Barr virus (EBV) in HIV-infected patients and its relation with primary brain lymphoma. *Int. J. Infect. Dis.*, 2007, vol. 11, no. 2, pp. 172–178. doi: 10.1016/j.ijid.2006.04.001
21. Gianella S., Massanella M., Wertheim J.O., Smith D.M. The Sordid Affair Between Human Herpesvirus and HIV. *J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 212, no. 6, pp. 845–852. doi: 10.1093/infdis/jiv148
22. Gianella S., Anderson C.M., Var S.R., Oliveira M.F., Lada S.M., Vargas M.V., Massanella M., Little S.J., Richman D.D., Strain M.C., Pérez-Santiago J., Smith D.M. Replication of Human Herpesviruses is associated with higher HIV DNA levels during antiretroviral therapy started at early phases of HIV infection. *J. Virol.*, 2016, vol. 90, no. 8, pp. 3944–3952. doi: 10.1128/JVI.02638-15
23. Giron L.B., Ramos da Silva S., Barbosa A.N., Monteiro de Barros Almeida R.A., Rosário de Souza L., Elgui de Oliveira D. Impact of Epstein–Barr virus load, virus genotype, and frequency of the 30 bp deletion in the viral BNLF-1 gene in patients harboring the human immunodeficiency virus. *J. Med. Virol.*, 2013, vol. 85, no. 12, pp. 2110–2118. doi: 10.1002/jmv.23722
24. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet: UNAIDS 2023 epidemiological estimates. URL: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet> (03.03.2024)
25. Hudnall S.D., Chen T., Allison P., Tying S.K., Heath A. Herpesvirus prevalence and viral load in healthy blood donors by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Transfusion*, 2008, vol. 48, no. 6, pp. 1180–1187. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01685.x
26. Lechowicz M.J., Lin L., Ambinder R.F. Epstein–Barr virus DNA in body fluids. *Curr. Opin. Oncol.*, 2002, vol. 14, no. 5, pp. 533–537. doi: 10.1097/00001622-200209000-00010
27. Linke-Serinsöz E., Fend F., Quintanilla-Martinez L. Human immunodeficiency virus (HIV) and Epstein–Barr virus (EBV) related lymphomas, pathology view point. *Semin. Diagn. Pathol.*, 2017, vol. 34, no. 4, pp. 352–363. doi: 10.1053/j.semmp.2017.04.003
28. Lupo J., Germi R., Lancar R., Algarte-Genin M., Hendel-Chavez H., Taoufik Y., Mounier N., Partisani M., Bonnet F., Meyohas M.C., Marchou B., Filippova A., Prevot S., Costagliola D., Morand P., Besson C. Prospective evaluation of blood Epstein–Barr virus DNA load and antibody profile in HIV-related non-Hodgkin lymphomas. *AIDS*, 2021, vol. 35, no. 6, pp. 861–868. doi: 10.1097/QAD.0000000000002839
29. McHugh D., Myburgh R., Caduff N., Spohn M., Kok Y.L., Keller C.W., Murer A., Chatterjee B., Rühl J., Engelmann C., Chijioke O., Quast I., Shilaih M., Strouvelle V.P., Neumann K., Menter T., Dirnhofer S., Lam J.K., Hui K.F., Bredl S., Schlaepfer E., Sorce S., Zbinden A., Capaul R., Lünemann J.D., Aguzzi A., Chiang A.K., Kempf W., Trkola A., Metzner K.J., Manz M.G., Grundhoff A., Speck R.F., Münz C. EBV renders B cells susceptible to HIV-1 in humanized mice. *Life Sci. Alliance*, 2020, vol. 3, no. 8: e202000640. doi: 10.26508/lsa.202000640
30. Miller C.S., Berger J.R., Mootoor Y., Avdiushko S.A., Zhu H., Kryscio R.J. High prevalence of multiple human herpesviruses in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 7, pp. 2409–2415. doi: 10.1128/JCM.00256-06
31. Montgomery N.D., Randall C., Painschab M., Seguin R., Kaimila B., Kasonkanji E., Zuze T., Krysiak R., Sanders M.K., Elliott A., Miller M.B., Kampani C., Chimzimu F., Mulenga M., Damania B., Tomoka T., Fedoriw Y., Dittmer D.P., Gopal S. High pretreatment plasma Epstein–Barr virus (EBV) DNA level is a poor prognostic marker in HIV-associated, EBV-negative diffuse large B-cell lymphoma in Malawi. *Cancer Med.*, 2020, vol. 9, no. 2, pp. 552–561. doi: 10.1002/cam4.2710
32. Mujtaba S., Varma S., Sehgal S. Coinfection with Epstein–Barr virus in north Indian patients with HIV/AIDS. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, 2005, vol. 48, no. 3, pp. 349–353.
33. Musukuma-Chifulo K., Siddiqi O.K., Chilyabanyama O.N., Bates M., Chisenga C.C., Simuyandi M., Sinkala E., Dang X., Koralknik I.J., Chilengi R., Munsaka S. Epstein–Barr Virus Detection in the Central Nervous System of HIV-Infected Patients. *Pathogens*, 2022, vol. 11, no. 10, pp. 1080. doi: 10.3390/pathogens11101080
34. Nowalk A., Green M. Epstein–Barr Virus. *Microbiol. Spectr.*, 2016, vol. 4, no. 3. doi: 10.1128/microbiolspec
35. O’Sullivan C.E., Peng R., Cole K.S., Montelaro R.C., Sturgeon T., Jenson H.B., Ling P.D. Epstein–Barr virus and human immunodeficiency virus serological responses and viral burdens in HIV-infected patients treated with HAART. *J. Med. Virol.*, 2002, vol. 67, no. 3, pp. 320–326. doi: 10.1002/jmv.1008
36. Petrara M.R., Cattelan A.M., Zanchetta M., Sasset L., Freguja R., Giancesin K., Cecchetto M.G., Carmona F., De Rossi A. Epstein–Barr virus load and immune activation in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J. Clin. Virol.*, 2012, vol. 53, no. 3, pp. 195–200. doi: 10.1016/j.jcv.2011.12.013
37. Piriou E., van Dort K., Otto S., van Oers M.H., van Baarle D. Tight Regulation of the Epstein–Barr Virus Setpoint: Interindividual Differences in Epstein–Barr Virus DNA Load Are Conserved after HIV Infection. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, vol. 46, no. 2, pp. 313–316. doi: 10.1086/524079
38. Sachithanandham J., Kannangai R., Pulimood S.A., Desai A., Abraham A.M., Abraham O.C., Ravi V., Samuel P., Sridharan G. Significance of Epstein–Barr virus (HHV-4) and CMV (HHV-5) infection among subtype-C human immunodeficiency virus-infected individuals. *Indian J. Med. Microbiol.*, 2014, vol. 32, no. 3, pp. 261–269. doi: 10.4103/0255-0857.136558
39. Santos L., Azevedo K., Silva L., Oliveira L. Epstein–Barr virus in oral mucosa from human immunodeficiency virus positive patients. *Rev. Assoc. Med. Bras. (1992)*, 2014, vol. 60, no. 3, pp. 262–269. doi: 10.1590/1806-9282.60.03.016
40. Stevens S.J., Blank B.S., Smits P.H., Meenhorst P.L., Middeldorp J.M. High Epstein–Barr virus (EBV) DNA loads in HIV-infected patients: correlation with antiretroviral therapy and quantitative EBV serology. *AIDS*, 2002, vol. 16, no. 7, pp. 993–1001. doi: 10.1097/00002030-200205030-00005
41. Suntornlohanakul R., Wanlapakorn N., Vongpunsawad S., Thongmee T., Chansaenroj J., Poovorawan Y. Seroprevalence of Anti-EBV IgG among Various Age Groups from Khon Kaen Province, Thailand. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2015, vol. 16, no. 17, pp. 7583–7587. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.17.7583

42. Traore L., Tao I., Bisseye C., Diarra B., Compaore T.R., Nebie Y., Assih M., Ouedraogo A., Zohoncon T., Djigma F., Ouermi D., Barro N., Sanou M., Ouedraogo R.T., Simpoire J. Molecular diagnosis of cytomegalovirus, Epstein–Barr virus and Herpes virus 6 among blood donors in Ouagadougou, Burkina Faso. *BMC Infect. Dis.*, 2014, vol. 14, no. 2: 99. doi: 10.11604/pamj.2016.24.298.6578
43. Traore L., Nikiema O., Ouattara A.K., Compaore T.R., Soubeiga S.T., Diarra B., Obiri-Yeboah D., Sorgho P.A., Djigma F.W., Bisseye C., Yonli A.T., Simpoire J. EBV and HHV-6 Circulating Subtypes in People Living with HIV in Burkina Faso, Impact on CD4 T cell count and HIV Viral Load. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, 2017, vol. 9, no. 1: e2017049. doi: 10.4084/MJHID.2017.049
44. Vangipuram R., Tyring S.K. AIDS-Associated Malignancies. *Cancer Treat. Res.*, 2019, vol. 177, pp. 1–21. doi: 10.1007/978-3-030-03502-0_1
45. Verdu-Bou M., Tapia G., Hernandez-Rodriguez A., Navarro J.T. Therapeutic Implications of Epstein–Barr Virus in HIV-Related Lymphomas. *Cancers (Basel)*, 2021, vol. 13, no. 1, pp. 5534. doi: 10.3390/cancers13215534
46. Wan Z., Chen Y., Hui J., Guo Y., Peng X., Wang M., Hu C., Xie Y., Su J., Huang Y., Xu X., Xu Y., Zhu B. Epstein–Barr virus variation in people living with human immunodeficiency virus in southeastern China. *Viol. J.*, 2023, vol. 20, no. 1: 107. doi: 10.1186/s12985-023-02078-z
47. Whitehurst C.B., Rizk M., Teklezghi A., Spagnuolo R.A., Pagano J.S., Wahl A. HIV co-infection augments EBV-induced tumorigenesis in vivo. *Front. Virol.*, 2022, vol. 2: 861628. doi: 10.3389/fviro.2022.861628
48. WHO case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children. *Geneva: World Health Organization*, 2007. 48 p.
49. Yao P., Millwood I., Kartsonaki C., Mentzer A.J., Allen N., Jeske R., Butt J., Guo Y., Chen Y., Walters R., Lv J., Yu C., Plummer M., de Martel C., Clifford G., Li L.M., Waterboer T., Yang L., Chen Z. Seroprevalence of 19 infectious pathogens and associated factors among middle-aged and elderly Chinese adults: a cross-sectional study. *BMJ Open*, 2022, vol. 12, no. 5: e058353. doi: 10.1136/bmjopen-2021-058353
50. Zealiyas K., Teshome S., Berhe N., Amogne W., Haile A.F., Abate E., Yimer G., Weigel C., Ahmed E.H., Abebe T., Baiocchi R. The Burden of Epstein–Barr Virus (EBV) and Its Determinants among Adult HIV-Positive Individuals in Ethiopia. *Viruses*, 2023, vol. 15, no. 8: 1743. doi: 10.3390/v15081743

Авторы:

Попкова М.И., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;
Филатова Е.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;
Минаева С.В., к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, г. Нижний Новгород, Россия;
Неумоина Н.В., к.м.н., главный врач клиники инфекционных болезней ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;
Перфилова К.М., к.м.н., зам. главного врача клиники инфекционных болезней ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;
Уткин О.В., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Popkova M.I., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Filatova E.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Minaeva S.V., PhD (Medicine), Associate Professor of the Epidemiology, Microbiology and Evidence-Based Medicine Department, Privolzhskiy Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation
Neumoina N.V., PhD (Medicine), Head Physician of the Infectious Diseases Clinic, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rosпотребнадзор, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Perfilova K.M., PhD (Medicine), Deputy Head Physician of the Infectious Diseases Clinic, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rosпотребнадзор, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Utkin O.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

MATRIX METALLOPROTEINASES-3 (MMP-3) SERUM LEVEL AND GENETIC POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

W.A. Al-Nuaimy, D.F. Salloom

College of Science, Baghdad University, Baghdad, Iraq

Abstract. *Introduction.* MMP-3 plays a crucial role in the process of bone erosion in the pathomechanism of rheumatoid arthritis (RA). It acts by removing the outer osteoid layer, which allows the osteoclasts to tightly connect and carry out the subsequent damage to the underlying bone. MMP-3 can trigger the production of other MMPs like MMP-1, MMP-7, and MMP-9, it plays a pivotal role in the remodeling of connective tissues. Aim of the study: to assess the influence of MMP-3 serum levels and single-nucleotide polymorphisms of rs679620 in the rheumatoid arthritis patients' group in comparison to the control group. Subjects: eighty eight samples, 45 rheumatoid arthritis patients after being referred by their treating physician for regular RA test. The remaining 43 samples all represent apparently healthy people. The present study investigated the serum concentration of MMP-3 and rs679620 SNPs in the group of patients with RA, in comparison to the control group. *Results.* The results indicated a significant elevation in MMP-3 levels in RA patients in comparison to healthy individuals (12.75 ± 0.38 vs 9.69 ± 0.37) and the findings of rs679620 SNPs appeared that the patient group has a non-significant increase in both allele frequency A and genotype frequency AA when compared to the control group (66.2 vs 52.2%; $p = 0.172$; OR = 1.79 and 35.3 vs 17.4%; $p = 0.229$; OR = 2.59), but a non-significant decrease in both allele frequency C and genotype frequency CC when compared to the control group (2.94 vs 4.4%; $p = 1.0$; OR = 0.67 and 2.9 vs 4.3%; $p = 1.0$; OR = 0.67), as well as a non-significant decrease in allele frequency G and both genotypes frequency GG and AG when compared to the control group (30.9 vs 43.5%; $p = 0.233$; OR = 0.58, 0.0 vs 8.7%; $p = 0.159$; OR = 0.12 and 61.8 vs 69.6%; $p = 0.585$; OR = 0.71). Patients carrying the AA and AG genotype, had significantly higher serum levels of MMP-3 compared to control ($P = 0.005$ and 0.004) respectively. *Conclusion.* Rs679620 may influence joint destruction via increase MMP-3 production.

Key words: Rs679620, MMP-3, RA patients, autoimmune diseases, matrix metalloproteinase, gene polymorphism.

УРОВЕНЬ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-3 (MMP-3) В СЫВОРОТКЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ, СВЯЗАННЫЙ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Аль-Нуайми В.А., Саллум Д.Ф.

Колледж науки Багдадского университета, Багдад, Ирак

Резюме. *Введение.* MMP-3 играет решающую роль в процессе эрозии кости в патогенезе ревматоидного артрита (РА), которая истощает внешний остеοидный слой, что позволяет остеοкластам плотно соединяться и далее повреждать подлежащую костную ткань. MMP-3 может запускать выработку других MMP, таких как MMP-1, MMP-7 и MMP-9, и играет ключевую роль в перестройке соединительных тканей. Цель исследования: оценить влияние уровня MMP-3 в сыворотке крови и однонуклеотидного полиморфизма rs679620 в гене

Адрес для переписки:

Вафа Аяд Аль-Нуайми
E-mail: wafaa.ayad@mu.edu.iq

Contacts:

Wafaa Ayad Al-Nuaimy
E-mail: wafaa.ayad@mu.edu.iq

Для цитирования:

Аль-Нуайми В.А., Саллум Д.Ф. Уровень матриксной металлопротеиназы-3 (MMP-3) в сыворотке и генетический полиморфизм, связанный с ревматоидным артритом // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 365–370. doi: 10.15789/2220-7619-MMM-17572

Citation:

Al-Nuaimy W.A., Salloom D.F. Matrix metalloproteinases-3 (MMP-3) serum level and genetic polymorphisms associated with rheumatoid arthritis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 365–370. doi: 10.15789/2220-7619-MMM-17572

© Al-Nuaimy W.A., Salloom D.F., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-MMM-17572>

ММР-3 в группе больных ревматоидным артритом по сравнению с контрольной группой. Материалы: изучены восемьдесят восемь образцов от 45 пациентов с ревматоидным артритом, направленных лечащим врачом на регулярное обследование на РА. Остальные 43 образца получены от практически здоровых людей. В настоящем исследовании изучалась сывороточная концентрация ММР-3 и SNP rs679620 в группе пациентов с РА по сравнению с контрольной группой. *Результаты.* Показано значительное повышение уровней ММР-3 у пациентов с РА по сравнению со здоровыми людьми ($12,75 \pm 0,38$ против $9,69 \pm 0,37$), а уровень представленности rs679620 в группе пациентов был незначительно повышен для аллеля А и генотипа АА по сравнению с контрольной группой (66,2 против 52,2%; $p = 0,172$; ОШ = 1,79 и 35,3 против 17,4%; $p = 0,229$; ОШ = 2,59), но незначительно снижена как для частоты аллеля С, так и частоты генотипа СС по сравнению с контрольной группой (2,94 против 4,4%; $p = 1,0$; ОШ = 0,67 и 2,9 против 4,3%; $p = 1,0$; ОШ = 0,67), а также и недостоверно снижена частоты аллеля G и частота обоих генотипов GG и AG по сравнению с контрольной группой (30,9 против 43,5%; $p = 0,233$; ОШ = 0,58, 0,0 против 8,7%; $p = 0,159$; ОШ = 0,12 и 61,8 против 69,6%; $p = 0,585$; ОШ = 0,71). Пациенты с генотипами АА и АG имели значительно более высокие уровни ММР-3 в сыворотке крови по сравнению с контролем ($P = 0,005$ и $0,004$ соответственно). *Вывод.* Rs679620 может влиять на разрушение суставов за счет увеличения продукции ММР-3.

Ключевые слова: Rs679620, ММР-3, больные РА, аутоиммунные заболевания, матриксная металлопротеиназа, полиморфизм генов.

Introduction

Extracellular matrix (ECM) components can be degraded by a group of zinc-dependent endopeptidases known as matrix metalloproteinases (MMPs) [24]. Since ECM breakdown is linked to embryonic development and angiogenesis, it is of critical importance. It also plays a role in cellular healing and tissue remodeling. Abnormal degradation of the ECM can result from changes in MMP expression. This is the root cause of diabetes-related vascular problems and other chronic degenerative illnesses [6]. Matrix metalloproteinases (MMPs) have been linked to chemokine activation and leukocyte infiltration during inflammatory responses [12]. MMP family has been implicated in tumor cell invasion and metastasis [23]. Rheumatoid arthritis (RA), is a persistent inflammatory disease that predominantly impacts the synovial membrane lining of the joints that ultimately lead to joint destruction [22]. In rheumatoid arthritis, your immune system attacks the tissue lining the joints on both sides of your body, other parts of the body may also be affected [16]. The risk of developing rheumatoid arthritis has been associated with HLA-DRB1 which contain 5 amino acids known as “shared epitope” [8]. Researchers are especially interested in viral causes [11][13] and immunity had been suggested to be involved in the pathophysiology of autoimmune diseases [2][20]. RA patients have elevated levels of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), also called (stromelysin-1). Based on screenings conducted over the past three decades, it appears that blood levels of MMP-3 predict disease outcome and medication response and positively reflect RA disease activity, bone and joint injury, and radiographic erosion [17]. The gene of MMP-3, which is part of a cluster of MMP genes, is located on human chromosome 11q22.3. During tissue remodeling, MMPs have a role in both normal physi-

ological processes like reproduction and embryonic development and pathological processes like arthritis and tumor spread. The majority of MMPs are released in their inactive pre-protein form and become active only after being cleaved by extracellular proteinases. In the joints, there are synovial fibroblasts and chondrocytes, produce the proteinase MMP-3. It plays a crucial role in the degeneration of joints in RA patients. Proteoglycans, fibronectin, laminin, and elastin, as well as collagens type II, III, IV, IX, and X, are all targets of the MMP-3 enzyme. Because MMP-3 can trigger the production of other MMPs like MMP-1, MMP-7, and MMP-9, it plays a pivotal role in the remodeling of connective tissues [5].

Materials and methods

Sample collection. In total, 88 samples were taken, 45 rheumatoid arthritis patients (18 in high disease activity and 27 in moderate disease activity, from the Baghdad-Teaching Hospital/Baghdad Province were enrolled in this study after being referred by their treating physician for regular RA tests [14]. The remaining 43 samples all represent apparently healthy people (with age and sex matched with the patients). 5 ml of venous blood was obtained from the subject. After letting 3 ml of blood clot for 30 minutes at room temperature (25°C) [25], then centrifugation for 15 minutes at 3000 RPM/min, the serum was collected and frozen at -20°C for further use in ELISA procedure, according to [21]. Serological examination of Human matrix metalloproteinases (MMP-3) concentrations was applied using (MMP-3) sandwich ELISA. The remaining 2 ml was placed in an EDTA tube for genomic tests involving the MMP-3 gene polymorphisms Rs679620. In terms of research ethics, the current study was greenlit in accordance with the Helsinki Declaration on the Human Protection in Experimental Research (World Medical Associa-

Table 1. The condition and primer information of Rs679620 MMP-3 gene polymorphisms

Primer	Sequence	Target gene	Size of product
rs679620	F 5'-CTTGCTTTGGAACAGCTTCAG-3'	MMP-3 (Chen et al., 2012)	634 bp
	R 5'-CTCTCCCAGACTTTCAGAGC-3'		

tion2013). To identify the existence of chronic and inflammatory ailments among all participants, a questionnaire was employed, and those individual with such conditions were subsequently not included in the study's results [15].

DNA extraction. DNA extraction was performed according to the manufacture instructions of (HiGenoMB, HIMEDIA, India), the protocol of DNA extraction from whole blood: The level of DNA samples that showed an adequate of level integrity was estimated by using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) with basic computerized software control and data recording, which was preceded by the use of TE buffer as a blank solution. 2 microliters of DNA were loaded to the Nanodrop to determine the concentration in ng/ μ l. The concentration was in the range of 40–120 ng/ μ l. In the DNA purity, the absorbance of the sample was measured at (260 and 280 nm) wavelengths using the nanodrop spectrophotometer. A260/A280 ratios between 1.7 and 1.9 indicate the presence of pure DNA.

Primer preparation. The NCBI-primer blast website was utilized for the primer design process. The information and condition of the primers were presented in Table 1.

Polymerase chain reaction. All PCR reactions were carried out in a 25 μ l final volume and according to the manufacturer's instructions. A quantity of 25 μ l of the reaction mixture (12 μ l of green master-mix, 2 μ l of DNA, 2 μ l of primers 9 μ l of nuclease free water) was added to each PCR tube. Following this, the tubes were sealed and subjected to a brief centrifugation to remove any air pockets and spin the contents down. The tubes were then transferred onto a miniopticon PCR thermocycler. Primer annealing temperature optimization: by applying gradient temperature (54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 and 64) $^{\circ}$ C, until reach to optimum annealing temperature. The annealing temperature of 62 $^{\circ}$ C for MMP-3 was optimum for producing clear and

sharp bands in agarose gel (Fig.). The PCR cyclor conditions were set according to the optimum primer annealing temperature and PCR Go Taq Green Master Mix kit instructions

Statistical analysis. Prior to computing the mean, Student's T-test and standard deviation, the normality, homogeneity, and distribution of the parametric data assessed using the software version 26.0 of the IBM SPSS application. A level of significance of 0.05 was used to assess the statistical significance of the calculated probability. Pearson's coefficient of chi-square was employed to compute the probability associated with the not parametric data. In addition, the odd ratio, 95% confidence interval and Fisher's exact probability were calculated by WinPepi version 11.65 [1] for the genotyping and alleles frequencies. Such for the genotyping and alleles frequencies calculations, an online Hardy-Weinberg calculator was used [4].

Results and discussion

Serum level of MMP-3. The result showed that concentrations of MMP-9 were significantly elevated in RA patients as appeared in Table 2.

Table 2 shows that MMP-3 concentrations were significantly elevated in patients ($P = 0.000003$), this is indicate that MMP-3 plays a pivotal role in bone destruction and cartilage components degradation in RA [10]. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin-1) is a protein-degrading enzyme that has been linked to RA-related joint destruction through its ability to degrade collagen (XI, IX, V, IV and III types), matrix proteins, and proteoglycans, as well as to activate other pro-MMPs (7,8 and 9) [19]. Serum matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) is an objective, practical, and disease-specific marker of ongoing illness and joint damage in rheumatoid arthritis (RA) patients, as shown here; these findings are consistent with those of [9], who found that MMP-3

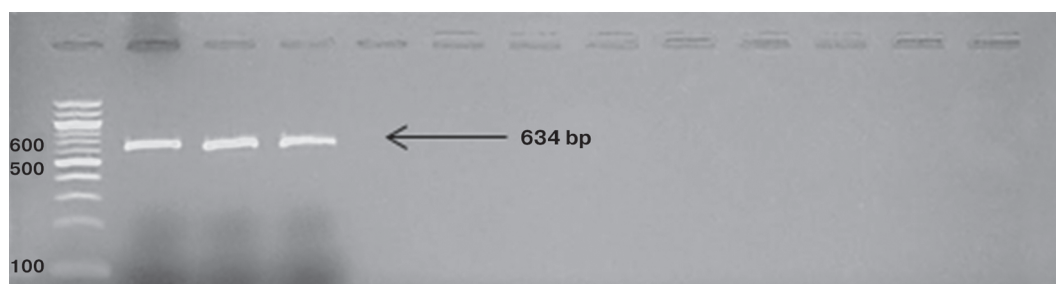


Figure. Gel electrophoresis for MMP-3 PCR product (Agarose 2%, at 100 volts for 45 min) visualized under U.V. light after staining with Red Safe Stain

Table 2. MMP-3 level in Patients and control groups

Group	MMP-3 level means±SE (pg/ml)		Probability
	Patients group	Control group	
Total	12.75±0.38	9.69±0.37	0.000003

Note. * is significant at $P \leq 0.05$.

Table 3. Serum levels of MMP-3 in relation to CDAI score in RA patients

Disease activity	MMP-3 level means±SE (pg/ml)		Probability
	Patients males	Patients females	
High	12.73±1.21	13.49±0.87	0.649
Moderate	13.23±0.45	12.21±0.50	0.432
Probability	0.793	0.156	

Note. * is significant at $P \leq 0.05$.

Table 4. The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and frequency distribution of the MMP-3 gene genotypes, rs679620, in blood samples from the patient and control groups

Genotyping of MMP-3 rs679620	Patients group No. (%) (n = 34)		Control group No. (%) (n = 23)	
	Observed	Expected	Observed	Expected
AA	12 (35.3)	14.89 (43.8)	4 (17.4)	6.3 (27.2)
AC	0 (0.0)	1.32 (3.9)	0 (0.0)	1.0 (4.5)
CC	1 (2.9)	0.03 (0.09)	1 (4.3)	0.04 (0.2)
AG	21 (61.8)	13.9 (40.9)	16 (69.6)	10.4 (45.4)
CG	0 (0.0)	0.62 (1.8)	0 (0.0)	0.9 (3.8)
GG	0 (0.0)	3.24 (9.5)	2 (8.7)	4.4 (18.9)
Total	34 (100.0)	34 (100.0)	23 (100.0)	23 (100.0)
P-HWE	Uncountable		Uncountable	

Notes. P-HWE: Probability of Hardy-Weinberg equilibrium. I degree of freedom (d.f.) for Chi-squared distribution.

Table 5. Genotype and allele frequencies of MMP-3 gene rs679620 of patients group and control group in blood samples

Genotyping of MMP-3 rs679620	Patients group No. (%) (n = 34)	Control group No. (%) (n = 23)	OR (95% CI)	Fisher's exact probability
A	45 (66.2)	24 (52.2)	1.79 (0.84–3.83)	0.172
C	2 (2.94)	2 (4.4)	0.67 (0.09–4.82)	1.0
G	21 (30.9)	20 (43.5)	0.58 (0.27–1.25)	0.233
AA	12 (35.3)	4 (17.4)	2.59 (0.73–9.15)	0.229
AC	0 (0.0)	0 (0.0)	–	Uncountable
CC	1 (2.9)	1 (4.3)	0.67 (0.04–10.66)	1.0
AG	21 (61.8)	16 (69.6)	0.71 (0.23–2.13)	0.585
CG	0 (0.0)	0 (0.0)	–	Uncountable
GG	0 (0.0)	2 (8.7)	0.12 (0.01–2.59)	0.159

OR: odd ratio, 95% CI: 95% confidence intervals

Table 6. Level distribution of MMP-3 in patients group and control group according to the genotypes (A/C/G rs679620)

Genotyping of MMP-3 rs679620	MMP-9 level mean±SE (pg/ml)		Probability
	Patients group	Control group	
AA	10.89±0.72 B	7.04±0.60 B	0.005
AC	–	–	–
CC	12.72 AB	12.71 AB	Uncountable
AG	13.33±0.59 A	10.39±0.42 A	0.004
CG	–	–	–
GG	–	6.23	–

ANOVA table: the similar letters referred to a non-significant difference ($P > 0.05$) among the genotyping of the same group.

was an important indicator for evaluating RA disease, stratifying disease activity, and predicting prognosis [18]. MMP-3 could be useful as a biological markers for rheumatoid arthritis disease activity assessment [3].

According to disease activity the MMP-3 mean values were insignificantly correlated with CDAI score in RA patients (Table 3), since both stages showed an increment with enzyme compared to healthy individuals. While Ahmed and Salloom. Indicated that patients with a high disease activity score had greater mean values of MMP-3 than those with a moderate or low disease activity score [2].

MMP-3 gene (rs679620). The SNP of MMP-3 gene (rs679620); located on Chromosome11 (chr11:102842889) was expected with six genotypes (AA, AC, CC, AG, CG and GG) and three alleles (A, C and G) in patients and control group. It was observed that genotypes frequencies in both groups of subjects disagree with Hardy–Weinberg (H-W) equilibrium because more than one genotypes were absent in both studied groups, so P value was uncountable. The genotypes (AC, CG and GG) weren't observed in patients group, while the two genotypes (AC and CG) were absent in control group (Table 4).

P-HWE: Probability of Hardy-Weinberg equilibrium. I degree of freedom (d.f.) for Chi-squared distribution. The patient group has a non-significant increase in both allele frequency A and genotype frequency AA when compared to the control group (66.2 vs 52.2%; $p = 0.172$; OR = 1.79 and 35.3 vs 17.4%; $p = 0.229$; OR = 2.59), but a non-significant decrease in both allele frequency C and genotype frequency CC when compared to the control group (2.94 vs 4.4%; $p = 1.0$; OR = 0.67 and 2.9 vs 4.3%; $p = 1.0$; OR = 0.67), as well as a non-significant decrease in allele frequency G and both genotypes frequency GG and AG when compared to the control group (30.9 vs 43.5%; $p = 0.233$; OR = 0.58, 0.0 vs 8.7%; $p = 0.159$; OR = 0.12 and 61.8 vs 69.6%; $p = 0.585$; OR = 0.71). Table 5 also showed that the AA and A allele exhibited a higher value of odd ratio (2.59 and 1.79) respectively, so it might be consider as a potential risk factor, while the genotypes CC, AG, GG and alleles C and G showed a lower value (0.67, 0.71, 0.12, 0.67 and 0.58) respectively, and this reflecting a protective property of these factors

The present findings appeared that there was a significant difference between the AA genotype and AG genotype in both studied groups. The two genotypes AA and AG showed a significant increase level of MMP-3 in the patients group compared to the control (10.89 ± 0.72 vs 7.04 ± 0.60 and 13.33 ± 0.59 vs 10.39 ± 0.42 pg/ml). In both patient and control groups the AG genotype was observed with the highest mean (13.33 ± 0.59 and 10.39 ± 0.42 pg/ml) respectively, compared to other genotypes (Table 6).

Patients and control carrying the AG genotype, had significantly higher serum levels of MMP-9 compared to AA genotype with in both studied groups. Patients carrying the AA and AG genotype, had significantly higher serum levels of MMP-3 compared to control ($P = 0.005$ and 0.004) respectively, so Rs679620 may influence joint destruction via increase MMP-3 production which was also associated with more severe joint damage. This agree with Chen et al. who indicated that Rs679620 have an important role in determining the circulating levels of MMP-3 in RA, and that MMP-3 polymorphism is associated with the level of disease activity over time [7].

Conclusion

Rs679620 may enhance MMP-3 production and joint destruction. Patients carrying the AA and AG genotype, had significantly higher serum levels of MMP-3 compared to control. AA and A allele exhibited a higher value of odd ratio (2.59 and 1.79) respectively, so they might be consider as potential risk factors, while the genotypes CC,AG,GG and alleles C and G showed a lower value of odd ratio (0.67, 0.71, 0.12, 0.67 and 0.58) respectively, and this reflecting their protective properties.

Additional information

Ethical approval. This study was approved by Baghdad University/College of Science Ethics committee (Ref: CSEC/0922/0079). Everyone signed a study-related informed consent. In compliance with the Helsinki Declaration, all human rights have been observed.

The Declaration of Competing Interest. The authors have declared no conflict of interest.

References

1. Abramson J.H. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiol/ Perspect/ Innov.*, 2011, vol. 8, no. 1: 1. doi: 10.1186/1742-5573-8-1
2. Ahmed D.M., Salloom D.F. The Association between Toll-like Receptor 7 and Hepatitis C Virus in a Sample of Iraqi Rheumatoid Arthritis Patients. *Journal of Global Pharma Technology*, 2018, vol. 10, iss. 11 (suppl.), pp. 1–8.
3. Al-Derzi A.R. The Contribution of Serum Anti–cyclic Citrullinated Peptide Antibody and Matrix Metalloproteinase-3 in Predicting the Activity of Rheumatoid Arthritis Disease. *J. Fac. Med. Bagdad*, 2017, vol. 59, no. 2, pp. 138–144. doi: 10.32007/jfacmedbagdad.592124
4. Andrews C. The Hardy-Weinberg principle. *Nat. Educ. Knowl.*, 2010, vol. 3, no. 10: 65.
5. Burrage P.S., Mix K.S., Brinckerhoff C.E. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front. Biosci.*, 2006, vol. 11, pp. 529–543. doi: 10.2741/1817

6. Cabral-Pacheco G.A., Garza-Veloz I., Castruita-De la Rosa C., Ramirez-Acuña J.M., Perez-Romero B.A., Guerrero-Rodriguez J.F., Martinez-Avila N., Martinez-Fierro M.L. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 24: 9739. doi: 10.3390/ijms21249739
7. Chen Y., Nixon N.B., Dawes P.T., Matthey D.L. Influence of variations across the MMP-1 and -3 genes on the serum levels of MMP-1 and -3 and disease activity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun.*, 2012, vol. 13, no. 1, pp. 29–37. doi: 10.1038/gene.2011.46
8. du Teil Espina M., Gabarrini G., Harmsen H.J.M., Westra J., van Winkelhoff A.J., van Dijk J.M. Talk to your gut: the oral-gut microbiome axis and its immunomodulatory role in the etiology of rheumatoid arthritis. *FEMS Microbiol Rev.*, 2019, vol. 43, no. 1, pp. 1–18. doi: 10.1093/femsre/fuy035
9. Fadda, S. Abolkheir, E. Afifi, R. Gamal M. Serum matrix metalloproteinase-3 in rheumatoid arthritis patients: correlation with disease activity and joint destruction. *The Egyptian Rheumatologist*, 2016, vol. 38, iss. 3, pp. 153–159. doi: 10.1016/j.ejr.2016.01.001
10. Galil S.M., El-Shafey A.M., Hagrass H.A., Fawzy F., Sammak A.E. Baseline serum level of matrix metalloproteinase-3 as a biomarker of progressive joint damage in rheumatoid arthritis patients. *Int. J. Rheum. Dis.*, 2016, vol. 19, no. 4, pp. 377–384. doi: 10.1111/1756-185X.12434
11. Hamid. Z.A. The Impact of Hepatitis B Virus and Epstein Barr Virus in Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 2017, vol. 10, no. 3, pp. 1495–1501. doi: 10.13005/bpj/1258
12. Ismael. MK; Aldabagh. MA; Rasuol. LM. Matrix Metalloproteinase-3 and Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 as Diagnostic Markers for COVID-19 Infection. *Iraqi Journal of Science*, 2022, vol. 63, no. 9, pp. 3679–3687. doi: 10.24996/ij.s.2022.63.9.2
13. Jassim N.S, Aboud R.S, Joda A.T. Detection of Epstein–Barr virus Capsid antigen (EBV CA) in Sera of Rheumatoid Arthritis, Reactive Arthritis and Ankylosing Spondylitis Patients. *Iraqi Journal of Science*, 2015, vol. 56, no. 4B, pp. 3130–3134.
14. Jonsson A., Hjalmarsson C., Falk P., Ivarsson M.L. Levels of matrix metalloproteinases differ in plasma and serum — aspects regarding analysis of biological markers in cancer. *Br. J. Cancer*, 2016, vol. 115, no. 6, pp. 703–706. doi: 10.1038/bjc.2016.127
15. Khamaes E.S., Al-Bayati N.Y., Abbas A.H. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) serum level and genetic polymorphisms associated with cutaneous leishmania infections. *Human Gene*, 2022, vol. 33: 201049. doi: 10.1016/j.humgen.2022.201049
16. Khayon L.H., Farhan A.A., Salloom D.F. Association of Interleukin-12B Polymorphism and Serum Level of Interleukin-12 in a Sample of Iraqi Patients with Rheumatoid Arthritis. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 2023, vol. 90, iss. 2, pp. 2071–2073. doi: 10.21608/EJHM.2023.285034
17. Lerner A., Neidhöfer S., Reuter S., Matthias T. MMP-3 is a reliable marker for disease activity, radiological monitoring, disease outcome predictability, and therapeutic response in rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2018, vol. 32, no. 4, pp. 550–562. doi: 10.1016/j.berh.2019.01.006
18. Liang Z., Wang N., Shang L., Wang Y., Feng M., Liu G., Gao C., Luo J. Evaluation of the immune feature of ACPA-negative rheumatoid arthritis and the clinical value of matrix metalloproteinase-3. *Front. Immunol.*, 2022, no. 13: 939265. doi: 10.3389/fimmu.2022.939265
19. Ma J.D., Zhou J.J., Zheng D.H., Chen L.F., Mo Y.Q., Wei X.N., Yang L.J., Dai L. Serum matrix metalloproteinase-3 as a non-invasive biomarker of histological synovitis for diagnosis of rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.*, 2014, no. 2014: 179284. doi: 10.1155/2014/179284
20. Mohammed H., Salloom D.F. Evaluation of interleukin-9 serum level and gene polymorphism in a sample of Iraqi type 2 diabetic mellitus patient. *Meta Gene*, 2021, vol. 27: 100845. doi: 10.1016/j.mgene.2020.100845
21. Sabnis R.W. Handbook of biological dyes and stains: synthesis and industrial application. *Hoboken, N.J.: Wiley*, 2010. 544 p.
22. Salloom D.F., Fadhil H.Y., Abbas A.H. Evaluation of leptin in sera of a sample of rheumatoid arthritis of iraqi patients. *International Journal of Recent Scientific Research*, 2013, vol. 4, no. 4, pp. 4–5.
23. Thaeer K., Abdulla B.H.; Kadhim K.R. Immunohistochemical expression of MMP-9, as a marker of local invasion in Hodgkin's and Non-Hodgkin's lymphoma of the head and neck region. *J. Bagh. Coll. Dent.*, 2015, vol. 27, no. 1, pp. 128–132.
24. Wang X., Khalil R.A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Adv. Pharmacol.*, 2018, vol. 81, pp. 241–330. doi: 10.1016/bs.apha.2017.08.002
25. Wu H., Liao W., Li Q., Long H., Yin H., Zhao M., Chan V., Lau C.S., Lu Q. Pathogenic role of tissue-resident memory T cells in autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.*, 2018, vol. 17, no. 9, pp. 906–911. doi: 10.1016/j.autrev.2018.03.014

Авторы:

Аль-Нуайми В.А., кандидат наук, Колледж науки Багдадского университета, Багдад, Ирак;

Саллум Д.Ф., доктор наук, профессор, научный руководитель Колледжа науки Багдадского университета, Багдад, Ирак.

Authors:

Al-Nuaimy W.A., Master in Science, PhD, College of Science, Baghdad University, Baghdad, Iraq;

Salloom D.F., DSc, Professor, Supervisor, College of Science, Baghdad University, Baghdad, Iraq.

Поступила в редакцию 20.01.2024
Отправлена на доработку 06.04.2024
Принята к печати 11.04.2024

Received 20.01.2024
Revision received 06.04.2024
Accepted 11.04.2024

ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМНОГО И ЛОКАЛЬНОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА ЖИВУЮ ГРИППОЗНУЮ ВАКЦИНУ ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В СОСТАВ ВАКЦИННОГО ШТАММА ГЕНА НУКЛЕОПРОТЕИНА ОТ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА

П.И. Прокопенко, Е.А. Степанова, В.А. Матюшенко, А.К. Чистякова, А.Д. Костромитина, Т.С. Котомина, А.Я. Рак, А.А. Рубинштейн, И.В. Кудрявцев, В.В. Новицкая, Л.Г. Руденко, И.Н. Исакова-Сивак

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Введение. Оптимизация поствакцинального репертуара Т-клеток — один из способов расширения спектра защитного потенциала живой гриппозной вакцины (ЖГВ). Улучшить кросс-протективные свойства ЖГВ можно путем внесения в состав генома вакцинного штамма гена нуклеопротеина (НР) от эпидемического родительского вируса, то есть при замене классической формулы генома 6:2 на 5:3. Ранее на примере вирусов гриппа H1N1, H3N2 и H7N9 было показано, что вакцинные штаммы ЖГВ 5:3 стимулируют более выраженный Т-клеточный ответ к эпитопам НР эпидемического родительского вируса, чем классические варианты ЖГВ 6:2. Основной целью настоящего исследования явилась детальная оценка субпопуляций вирусспецифических системных и тканерезидентных Т-клеток памяти у мышей, иммунизированных штаммами сезонной ЖГВ подтипа H1N1 с формулами генома 6:2 и 5:3. **Материалы и методы.** Методами обратной генетики были сконструированы вакцинные штаммы ЖГВ подтипа H1N1, отличающихся источником гена НР (ЖГВ 6:2 и ЖГВ 5:3). Мышей линии C57BL/6J иммунизировали интраназально вакцинными кандидатами, двукратно с трехнедельным интервалом. Через 7 дней после повторной иммунизации у мышей выделяли клетки из тканей селезенки и легких, стимулировали цельным вирусом гриппа H1N1 и оценивали уровни цитокин-продуцирующих Т-клеток памяти с фенотипом CD44⁺CD62L⁻ методами проточной цитометрии. Для клеток, выделенных из легких, также определяли экспрессию поверхностных маркеров CD69 и CD103. Гуморальный иммунитет к вирусу H1N1 оценивали в иммуноферментном анализе сывороток крови мышей, собранных через 3 недели после повторной иммунизации. **Результаты.** Вакцинный штамм ЖГВ 5:3, несущий НР ген от эпидемического родителя, индуцировал достоверно более выраженный гуморальный иммунный ответ к актуальному вирусу гриппа, чем классический вариант ЖГВ 6:2. В группе мышей, привитых ЖГВ 5:3,

Адрес для переписки:

Прокопенко Полина Игоревна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-92-14.
E-mail: pi.prokopenko@gmail.com

Contacts:

Polina I. Prokopenko
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Academician
Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-92-14.
E-mail: pi.prokopenko@gmail.com

Для цитирования:

Прокопенко П.И., Степанова Е.А., Матюшенко В.А., Чистякова А.К., Костромитина А.Д., Котомина Т.С., Рак А.Я., Рубинштейн А.А., Кудрявцев И.В., Новицкая В.В., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н. Оптимизация системного и локального Т-клеточного иммунного ответа на живую гриппозную вакцину при включении в состав вакцинного штамма гена нуклеопротеина от эпидемического вируса гриппа // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 371–380. doi: 10.15789/2220-7619-EIV-17590

Citation:

Prokopenko P.I., Stepanova E.A., Matyushenko V.A., Chistyakova A.K., Kostromitina A.D., Kotomina T.S., Rak A.Ya., Rubinstein A.A., Kudryavtsev I.V., Novitskaya V.V., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N. Epidemic influenza virus nucleoprotein gene incorporated into vaccine influenza virus strain genome to optimize systemic and local T-cell immune response against live attenuated influenza vaccine // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 371–380. doi: 10.15789/2220-7619-EIV-17590

Работа выполнена в рамках проекта Минобрнауки FGWG-2022-0001.

The study was carried out within the framework of the Ministry of Education and Science project FGWG-2022-0001.

© Прокопенко П.И. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-EIV-17590>

наблюдались более высокие уровни вирусспецифических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток эффекторной памяти (T_{EM}) в селезенках мышей, включая субпопуляцию полифункциональных (IFNγ⁺TNFα⁺IL-2⁺) CD4⁺ T_{EM}, по сравнению с группой ЖГВ 6:2. Также наблюдалась тенденция к выработке более высоких уровней вирусспецифических Т-клеток памяти в тканях легких при иммунизации ЖГВ 5:3 в сравнении с ЖГВ 6:2, однако достоверной разницы в стимуляции тканерезидентных Т-клеток с фенотипами CD69⁺CD103⁻ и CD69⁺CD103⁺ между группами не наблюдалось. **Заключение.** Получены дополнительные экспериментальные свидетельства перспективности модификации генома вакцинного штамма сезонной живой гриппозной вакцины с целью актуализации эпитопного состава вакцинных вирусов, поскольку такая модификация усиливает вирусспецифический Т-клеточный иммунный ответ как на системном уровне, так и в тканях легких, что в итоге может повысить эффективность вакцины в отношении циркулирующих вирусов гриппа.

Ключевые слова: вирус гриппа, живая гриппозная вакцина, нуклеопротеин, гуморальный иммунитет, IgG, эффекторная память, T_{EM}, тканерезидентные Т-клетки памяти, TRM.

EPIDEMIC INFLUENZA VIRUS NUCLEOPROTEIN GENE INCORPORATED INTO VACCINE INFLUENZA VIRUS STRAIN GENOME TO OPTIMIZE SYSTEMIC AND LOCAL T-CELL IMMUNE RESPONSE AGAINST LIVE ATTENUATED INFLUENZA VACCINE

Prokopenko P.I., Stepanova E.A., Matyushenko V.A., Chistyakova A.K., Kostromitina A.D., Kotomina T.S., Rak A.Ya., Rubinstein A.A., Kudryavtsev I.V., Novitskaya V.V., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Introduction. Optimization of the vaccine-induced T-cell repertoire is one of the strategies to expand the spectrum of protective potential for live attenuated influenza vaccine (LAIV). LAIV cross-protective properties can be improved by introducing the nucleoprotein (NP) gene derived from epidemic parental virus into vaccine strain genome, i.e. by replacing the classical 6:2 genome formula with 5:3. The main objective of the present study was to detail evaluation for virus-specific systemic and tissue-resident memory T-cells subsets in mice immunized with seasonal H1N1 LAIV of the genome formula 6:2 and 5:3. **Materials and methods.** Two H1N1 LAIV strains with varying NP genes (LAIV 6:2 and LAIV 5:3) were generated using reverse genetics techniques. C57BL/6J mice were immunized intranasally with the vaccine candidates, twice, 3 weeks apart. Cells from the spleen and lung tissues were isolated 7 days after booster immunization to be stimulated with whole H1N1 influenza virus for assessing cytokine-producing memory CD44⁺CD62L⁻ T-cells as well as expression of CD69 and CD103 surface markers using flow cytometry. Humoral murine serum immunity against H1N1 virus was assessed by ELISA. **Results.** The LAIV 5:3 vs classical 6:2 vaccine strain carrying the epidemic parental NP gene induced significantly more pronounced humoral immune response against recent influenza virus. The group of mice immunized with LAIV 5:3 demonstrated higher levels of virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ effector memory T cells (T_{EM}) in the spleen, including a subset of polyfunctional (IFNγ⁺TNFα⁺IL-2⁺) CD4⁺ T_{EM}, compared to LAIV 6:2 group. Virus-specific memory T cell levels in lung tissues after immunization with LAIV 5:3 vs LAIV 6:2 also tended to increase, but no significant difference in stimulated tissue-resident CD69⁺CD103⁻ and CD69⁺CD103⁺ T cells between the groups were found. **Conclusion.** Modification of the seasonal LAIV strain genome for updating its epitope composition allowed to enhance the virus-specific T-cell immune response both at systemic level and in lung tissues, thereby showing that the effectiveness of the vaccine against circulating influenza viruses can be potentially increased.

Key words: influenza virus, live influenza vaccine, nucleoprotein, humoral immunity, IgG, effector memory, T_{EM}, tissue-resident memory T cells, TRM.

Введение

Вирусы гриппа являются высококонтагиозными респираторными патогенами, которые представляют постоянную угрозу для мирового здравоохранения. Ежегодные эпидемии гриппа вызывают до 5 млн случаев тяжелых респираторных заболеваний, до 650 000 которых приводят к летальному исходу [9]. Вакцинация является наиболее эффективным средством профилактики гриппа, поскольку она может значительно снизить риск заражения гриппом, а также тяжесть и продолжительность заболевания [4, 6].

В настоящее время в мировой практике существует большое разнообразие вакцин против

вируса гриппа, однако их общим недостатком является достаточно узкая специфичность, что приводит к снижению эффективности вакцинации при циркуляции дрейфовых вариантов вируса, и, как следствие — к необходимости регулярного обновления штаммового состава вакцин [16, 17]. Лицензированные сезонные вакцины против гриппа направлены на поверхностные антигены вируса — гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA). В результате вакцинации преимущественно индуцируются нейтрализующие антитела против иммунодоминантных гипервариабельных эпитопов поверхностных вирусных белков, обеспечивая ограниченную защиту от антигенно удаленных вирусов гриппа. Поэтому поиск новых подходов

для повышения иммуногенности и эффективности гриппозных вакцин является приоритетной задачей здравоохранения. За последнее десятилетие был достигнут существенный прогресс в разработке противогриппозных вакцин широкого спектра действия, которые направлены на индукцию антител к консервативным вирусным антигенам, таким как HA, NA или внеклеточный домен M2 белка (M2e) [8, 29]. Кроме того, активно разрабатываются подходы на основе Т-клеток, поскольку такие вакцины имеют наибольший потенциал для индукции долгоживущих кросс-протективных факторов иммунной защиты [22]. Однако разработка новых Т-клеточных вакцин сопровождается серьезными трудностями, такими как большое разнообразие генов главного комплекса гистосовместимости в популяции, отсутствие адекватных животных моделей для тестирования таких вакцин в доклинических исследованиях, а также недостаток информации о том, какие уровни субпопуляций Т-клеток коррелируют с защитой от инфекции [8]. Соответственно, помимо создания новых вакцин, нацеленных на индукцию Т-клеток памяти к консервативным вирусным антигенам, не менее важной задачей является усовершенствование лицензированных гриппозных вакцин. В частности, одним из способов расширения спектра защитного потенциала живой гриппозной вакцины (ЖГВ) является оптимизация репертуара Т-клеток, которые образуются после вакцинации.

Известно, что, изолированного в 1957 г., вполне вероятно, что некоторые индуцированные ЖГВ Т-клетки больше не смогут распознать эпитопы циркулирующих в настоящее время вирусов гриппа. Несмотря на достаточно высокий уровень консервативности NP среди различных вирусов гриппа А, за последние десятилетия данный белок приобрел значительное количество мутаций, входящих в иммуногенные Т-клеточные эпитопы [19, 31]. Ранее нами была показана принципиальная [7, 21].

Целью настоящего исследования явилась детальная оценка субпопуляций вирусспецифических системных и тканерезидентных Т-клеток памяти у мышей, иммунизированных штаммами сезонной ЖГВ подтипа H1N1 с формами генома 6:2 и 5:3.

Материалы и методы

Вирусы. Экспериментальные реассортантные штаммы подтипа H1N1 были получены стандартными методами обратной генетики на основе донора аттенуации отечественной живой гриппозной вакцины (ЖГВ) А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Лен/17) по описанной ранее методике [21]. В качестве родительского эпидемиологического

вируса гриппа выступал штамм А/Гуандун-Маонань/SWL1536/2019 (H1N1) [H1N1/wt], полученный из коллекции NIBSC (Великобритания). Вакцинные штаммы содержали гены PB2, PB1, PA, M, NS от донора аттенуации Лен/17, а гены гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA) — от вируса H1N1/wt. Ген нуклеопротеина (NP) у штамма ЖГВ 6:2 был унаследован от донора аттенуации Лен/17, а у штамма ЖГВ 5:3 — от эпидемиологического вируса H1N1/wt. Вирусы культивировали в 10–11 дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) при 33°C (для вакцинных штаммов ЖГВ) или при 37°C (для эпидемиологического штамма H1N1/wt). Инфекционные титры определяли методом предельных разведений на РКЭ, подсчитывали по методу Рида и Менча [20] и выражали в IgЭИД₅₀/мл.

Для проведения иммунологических тестов вирус гриппа H1N1/wt очищали методом ультрацентрифугирования на градиенте плотности сахарозы. Для этого вирусную биомассу наращивали в РКЭ, и после осаждения дебриза низкоскоростным центрифугированием надосадочную жидкость подвергали центрифугированию с ускорением 34000g в течение 2-х часов с использованием ультрацентрифуги Optima L-100 XP (Beckman Coulter, США). После этого ресуспендированный в PBS осадок очищали на ступенчатом градиенте сахарозы (30% и 60%) с ускорением 23 000g в течение 1 часа. Фракцию, содержащую вирусные частицы, собирали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), после чего проводили финальное центрифугирование с ускорением 23 000g в течение 1 часа. Осадок ресуспендировали в 1 мл ФСБ, аликвотили и хранили при –70°C.

Иммунизация мышей. Для эксперимента по оценке иммуногенности и кросс-протективного действия сконструированных вакцинных кандидатов подтипа H1N1 использовали самок мышей линии C57BL/6J, поставляемых из питомника Филиал Столбовая ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Через 3 недели после повторной иммунизации у мышей собирали сыворотки крови для оценки гуморального иммунного ответа в иммуноферментном анализе (ИФА). Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 1/20 от 27.02.2020).

Оценка гуморального иммунного ответа. Уровни сывороточных IgG-антител к цельному вирусу А/H1N1wt были определены с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) по стандартному протоколу. Планшеты с высокой сорбцией покрывали очищенным на градиенте плотности сахарозы вирусом гриппа А/H1N1wt. После отмывок и блокировки неспецифического связывания с помощью раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА), в лунки вносили

2-кратные разведения сывороток мышей. После инкубации и соответствующих промывок проводили детекцию связанных с антигеном IgG антител при помощи вторичных антител к IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (BioRad, США). Проявку планшетов осуществляли с использованием субстрата 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo, США). Реакцию останавливали добавлением 1M раствора H_2SO_4 , после чего измеряли оптическую плотность раствора при 450 нм (OP_{450}) с помощью спектрофотометра xMark (BioRad, США). За титр сыворотки принимали максимальное разведение образца, при котором OP_{450} превышало в 2 раза среднее значение OP_{450} контрольных лунок (антиген без добавления сыворотки).

Оценка Т-клеточного иммунного ответа.

Определение системных и локализованных в легких Т-клеток памяти проводилось по ранее описанному методу [18] с некоторыми модификациями. В отличие от указанного исследования, где иммунный ответ оценивался путем стимуляции клеток синтетическими пептидами, соответствующими иммунодоминантным $CD8^+$ Т-клеточным эпитопам NP366 современного и устаревшего вирусов, в настоящей работе проводили стимуляцию иммунных клеток цельным очищенным вирусом А/Гуандун-Маонань/SWL1536/2019 (H1N1). Такая стимуляция лучше отражает реальную клиническую ситуацию, поскольку при гриппе организм сталкивается с циркулирующим вирусом в его естественном виде, и инфицированные клетки презентуют на комплексах МНС I и МНС II большое разнообразие Т-клеточных вирусных эпитопов. Одиночные спленоциты выделяли в среде CR-0 (RPMI-1640, с содержанием антибиотика-антимикотика, 25 мМ HEPES (все от Capricorn, Германия) и 50 мкМ 2-меркаптоэтанолом (Sigma, США)), используя фильтры с размером пор 70 мкм (BD Biosciences, США). Затем эритроциты лизировали с помощью буфера для лизиса эритроцитов (Biolegend, США). Для внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) 2×10^6 клеток добавляли в стерильные микропланшеты с U-образным дном в 100 мкл среды CR-10 (среда CR-0, содержащая 10% эмбриональной бычьей сыворотки). Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл среды CR-10, содержащей очищенный вирус H1N1/wt в дозе 2 инфекционные единицы на клетку, и инкубировали в течение 18 часов при $37^\circ C$, 5% CO_2 . Затем к пробам добавляли раствор GolgiPlugTM (BD Biosciences, США), в конечной концентрации 1:1000 для остановки белкового транспорта. Стимуляция форболмирикатом ацетата (PMA) (Sigma, США) использовалась в качестве положительного контроля; также были приготовлены нестимулированные контрольные образцы и образцы изотипическо-

го контроля. Клетки инкубировали в течение 5 ч при $37^\circ C$, 5% CO_2 , затем окрашивали в течение 20 мин при $4^\circ C$ в темноте с помощью флуоресцентного красителя для фиксации живых/мертвых клеток (ZombieAqua, Invitrogen, США) и смесью следующих флуоресцентно меченных поверхностных антител: CD4-PerCP/Cy5.5, CD8-APC/Cy7, CD44-PE, и CD62LBV421 (все от BioLegend, США). Набор Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, США) использовался для фиксации/пермеабиллизации, после чего клетки окрашивали антителами к цитокинам IFN γ -FITC, TNF α -APC и IL2-PE/Cy7 (все от BioLegend) в течение 20 мин при $4^\circ C$ в темноте. Образцы фиксировали буфером Cytolast (Biolegend) и анализировали с помощью флуориметра «Navios» (Beckman Coulter, США).

Для обнаружения тканерезидентных Т-клеток памяти (TRM) перфузированные легкие разрезали на мелкие кусочки стерильными ножницами и обрабатывали смесью ДНКазы I и коллагеназы (обе от Sigma) в течение 40 мин при $37^\circ C$. Затем готовили суспензию отдельных клеток с помощью фильтров с размером пор 70 мкм. Эритроциты лизировали, как описано выше, а стимуляцию клеток проводили по той же процедуре, что и для спленоцитов, только для окраски поверхностных маркеров и внутриклеточных цитокинов использовали другой набор антител. Набор поверхностных антител включал CD4-PerCP/Cy5.5, CD8-APC/Cy7, CD44-APC, CD62L-BV421, CD69-PE/Cy7, и CD103-FITC (все от BioLegend, США), в то время как внутриклеточно проводили окраску на один цитокин — IFN γ -PE/Dazzle. Подсчитывали количество цитокин-позитивных клеток в стимулированных группах и вычитали уровень спонтанной секреции цитокинов в нестимулированных контрольных образцах.

Статистическая обработка результатов.

Для анализа данных проточной цитометрии использовали программу Kaluza Analysis (Beckman Coulter). Для расчетов, статистического анализа и подготовки иллюстраций использовали программу GraphPad Prism 7.0. Сравнение данных проводилось с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки или U-критерия Манна-Уитни, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для данного исследования с использованием методов обратной генетики были сконструированы два вакцинных штамма ЖГВ, отличающиеся источником гена NP. У штамма ЖГВ 6:2 гены NA и NA унаследованы от эпидемического вируса H1N1/wt, остальные гены — от донора аттенуации Лен/17. У штамма ЖГВ 5:3 три гена —

НА, NA и NP — были унаследованы от H1N1/wt, остальные гены также принадлежали Лен/17. Накопленные в РКЭ вирусы характеризовались высокой инфекционной активностью: штамм ЖГВ 6:2 размножался в РКЭ при оптимальной температуре 33°C до титра 9,5 IgЭИД₅₀/мл, а штамм ЖГВ 5:3 — до 8,9 IgЭИД₅₀/мл. Эти данные указывают на отсутствие негативного влияния NP гена от эпидемического родителя на репликативные свойства вакцинного штамма ЖГВ.

У мышей, двукратно иммунизированных исследуемыми штаммами, собирали иммунные сыворотки и оценивали уровни IgG антител в ИФА с использованием цельного эпидемического вируса в качестве антигенной подложки. Было показано, что кандидат, несущий NP ген от эпидемического родителя (штамм ЖГВ 5:3), индуцировал достоверно более выраженный гуморальный иммунный ответ к вирусу гриппа, чем классический вариант ЖГВ 6:2 (рис. 1). Эти данные могут указывать на то, что при иммунизации ЖГВ антитела формируются не только к поверхностным антигенам вируса гриппа, но и к его нуклеопротеину. Действительно, гриппозная инфекция и вакцинация цельновирионными вакцинами (как живыми, так и инактивированными) приводит к выработке сывороточных IgG-антител к NP-белку [5], при этом они не обладают вирус-нейтрализующей активностью. Несмотря на то что этот антиген не представлен на поверхности вириона, он детектируется в большом количестве на поверхности зараженных вирусом клеток [1, 28], что дела-

ет его потенциальной мишенью для антитело-зависимых иммунных реакций, таких как антитело-зависимая клеточная цитотоксичность или комплемент-зависимая цитотоксичность [10, 27]. Поскольку NP белок донора аттенуации Лен/17 и современного эпидемического вируса H1N1 отличается на 29 аминокислотных остатка, эти различия могут оказывать существенное действие на антигенные свойства данного белка. Соответственно, анти-NP антитела, выработанные в ответ на иммунизацию вариантом ЖГВ 6:2, могут распознавать не все В-клеточные эпитопы NP белка современного вируса гриппа.

Основной целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка уровней вирус-специфических Т-клеток, индуцируемых в ответ на иммунизацию штаммами ЖГВ с формулами генома 6:2 и 5:3, как на системном (в селезенках), так и на локальном уровне (в тканях легких). В более раннем исследовании нами было показано, что вакцинный штамм подтипа H1N1 с формулой генома 5:3 стимулирует более выраженный системный Т-клеточный иммунный ответ по сравнению с классическим вариантом ЖГВ 6:2, что выявлялось в результате стимуляции спленоцитов иммунизированных мышей цельным вирусом H1N1/wt [21]. При этом иммунный ответ ранее оценивался по продукции одного цитокина в ответ на стимуляцию вирусом, а именно IFN γ . Данный цитокин относится к интерферонам II типа — семейству белков, изначально ассоциированных с ингибированием вирусной репликации [30].

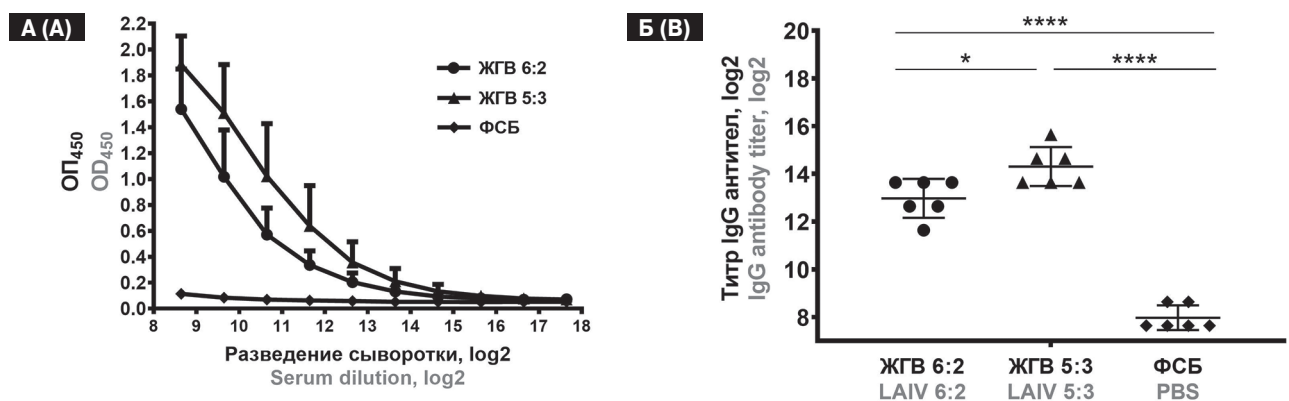


Рисунок 1. Выявление вирусспецифических IgG-антител в сыворотках крови мышей, иммунизированных двукратно вакцинными штаммами ЖГВ 6:2 и ЖГВ 5:3

Figure 1. Detection of blood serum virus-specific IgG antibodies in mice immunized twice with LAIV 6:2 and LAIV 5:3 strains

Примечания. Уровни антител выявлялись в иммуноферментном анализе с использованием цельного вируса А/Гуандун-Маонань/SWL1536/2019 (H1N1). А. Средние значения оптической плотности в лунках при каждом разведении сывороток. Б. Значения титров антител в каждой исследуемой группе. Сравнение данных проводилось с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$).

Notes. Antibody levels were detected by ELISA using whole virus A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1). A. Average values of optical density in wells at each serum dilution. B. Values of antibody titers in each study group. The data were compared using the ANOVA variance analysis with Tukey's correction (* $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$).

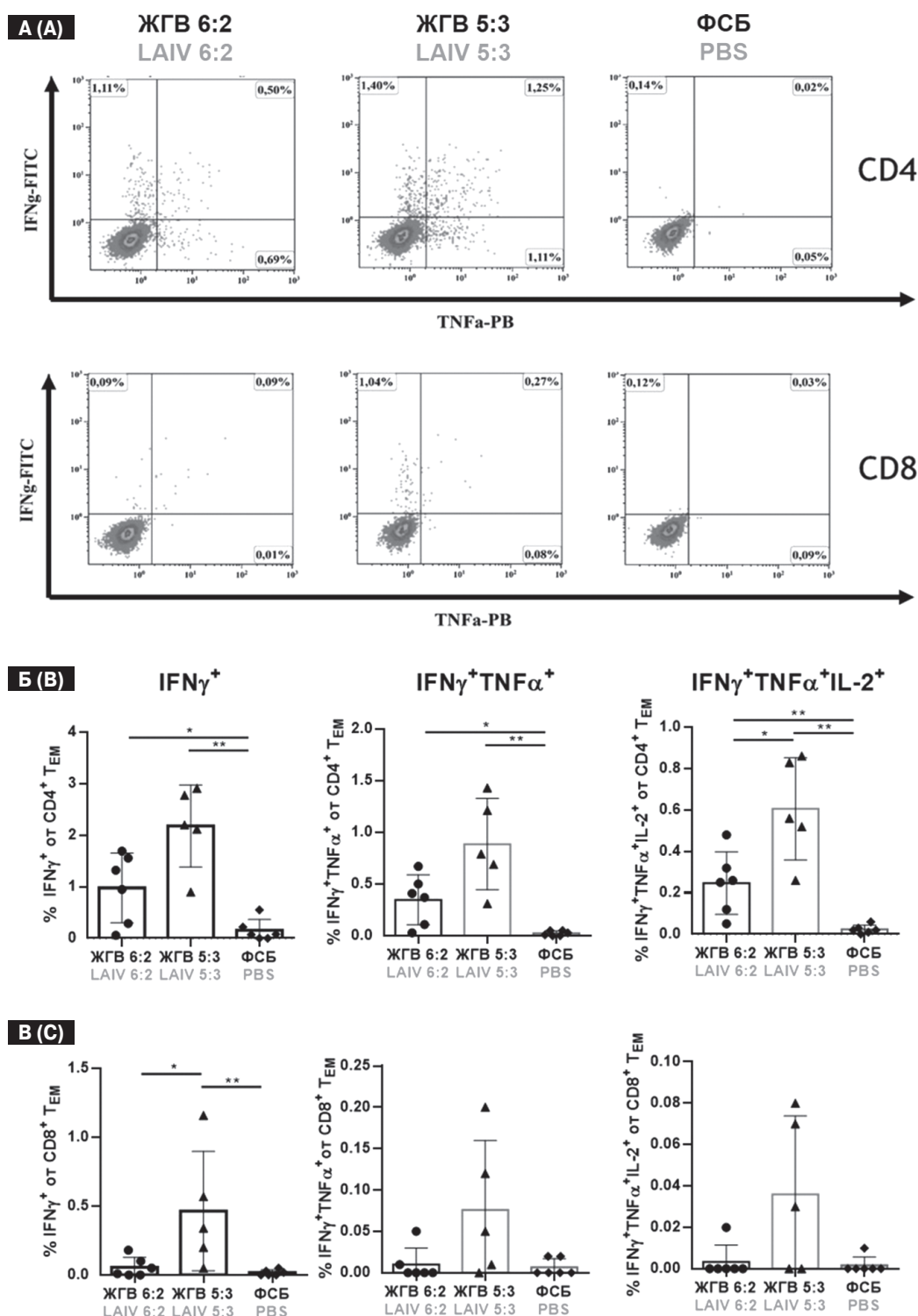


Рисунок 2. Индукция системного Т-клеточного ответа в ответ на иммунизацию вакцинными штаммами ЖГВ 6:2 и ЖГВ 5:3

Figure 2. Induction of systemic T-cell response by immunization with LAIV 6:2 and LAIV 5:3 strains

Примечания. А. Репрезентативные дот-плот графики данных проточной цитометрии спленоцитов мышей после стимуляции цельным вирусом H1N1/wt. Б. Уровни цитокин-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток среди популяции эффекторной памяти (CD44⁺CD62L⁻). В. Уровни цитокин-продуцирующих CD8⁺ Т-клеток среди популяции эффекторной памяти (CD44⁺CD62L⁻). Представлены субпопуляции T_{EM}, продуцирующие IFN γ (слева), IFN γ и TNF α (посередине), и IFN γ , TNF α и IL-2 (справа) в ответ на двукратную вакцинацию. * p < 0,05, ** p < 0,01.

Notes. A. Representative dot-plot graphs of mouse splenocyte flow cytometry data after stimulation with whole H1N1/wt virus. B. Levels of cytokine-producing CD4⁺ T cells among the effector memory population (CD44⁺CD62L⁻). C. Cytokine-producing CD8⁺ T cell levels among effector memory population (CD44⁺CD62L⁻). The subpopulations of T_{EM} producing IFN γ (left), IFN γ and TNF α (middle), and IFN γ , TNF α and IL-2 (right) in response to double vaccination are presented. * p < 0.05, ** p < 0.01.

В настоящее время известно, что $IFN\gamma$ активно продуцируется антиген-активированными Т-лимфоцитами и цитокин-активированными врожденными лимфоидными клетками группы 1 (ILC1) [11], вследствие чего именно этот цитокин чаще всего используется для выявления вирусспецифических Т-клеток в экспериментальных исследованиях. Однако не менее важно оценивать способность иммунных клеток продуцировать и другие ключевые провоспалительные цитокины, участвующие в противовирусном ответе, такие как фактор некроза опухоли альфа ($TNF\alpha$) и интерлейкин 2 (IL-2). Полифункциональные Т-клетки, способные продуцировать сразу несколько цитокинов, являются более точными предикторами способности организма противостоять реинфекции, чем монофункциональные клетки с секрецией $IFN\gamma$ [15], причем $CD4^+$ Т-клетки, продуцирующие только $IFN\gamma$, значительно отличаются от полифункциональных клеток даже по транскрипционному профилю [2].

В настоящем исследовании выявляли субпопуляции полифункциональных вирусспецифических Т-клеток памяти у мышей, двукратно иммунизированных вакцинными штаммами ЖГВ 6:2 и ЖГВ 5:3. Для этого спленоциты иммунизированных животных стимулировали цельным вирусом H1N1/wt и определяли пропорции $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти с фенотипом $CD44^+CD62L^-$ (T_{EM}), отвечающих на стимуляцию продукцией цитокинов $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ или IL-2 (рис. 2). Оба вакцинных штамма приводили к образованию высоких уровней $CD4^+$ цитокин-продуцирующих Т-клеток значительно отличаясь от контрольной группы животных (рис. 2Б), что указывает на наличие в белках вакцинных штаммов консервативных Т-клеточных эпитопов, которые могут распознавать эпитопы эпидемического вируса H1N1/wt. Важно отметить, что уровень $CD8^+$ $IFN\gamma$ -продуцирующих T_{EM} в группе ЖГВ 5:3 был значительно выше такового в группе ЖГВ 6:2, что свидетельствует о более релевантном стимулировании Т-клеток памяти при иммунизации вакцинным штаммом с актуализированным геном NP (рис. 2В). Наиболее важным результатом данного раздела работы явилось обнаружение значительного уровня полифункциональных ($IFN\gamma^+TNF\alpha^+IL-2^+$) $CD4^+$ T_{EM} в спленоцитах мышей, привитых ЖГВ 5:3, который значительно превышал содержание таких клеток в группе классической ЖГВ 6:2 (рис. 2Б). Для $CD8^+$ T_{EM} клеток также была выявлена тенденция к увеличению пропорции полифункциональных Т-клеток, однако из-за небольшого количества животных в группе и высокой дисперсии различия между группами не были достоверными (рис. 2В). Таким образом, исследование систем-

ного Т-клеточного иммунитета, образованного в ответ на иммунизацию экспериментальными штаммами ЖГВ подтипа H1N1, выявило преимущества модифицированного варианта с формулой генома 5:3 по сравнению с классическим штаммом ЖГВ 6:2 в плане индукции системных моно- и полифункциональных вирусспецифических Т-клеток эффекторной памяти, что согласуется с данными, полученными нами ранее для вакцинных штаммов ЖГВ подтипа H7N9, где спленоциты были стимулированы пептидом, соответствующим иммунодоминантному эпитопу NP366 современного вируса [18].

Следует отметить, что в ранних исследованиях с сезонным вирусом гриппа H1N1 не изучалось формирование субпопуляций тканерезидентных (локализующихся в тканях легких) Т-клеток памяти (TRM), которые представляют собой первую линию адаптивной клеточной защиты организма от схожего по эпитопному составу респираторного патогена [25, 26]. На предыдущем этапе исследования были изучены особенности формирования TRM клеток в ответ на иммунизацию вакцинным штаммом ЖГВ 5:3 подтипа H7N9, однако в том случае стимуляцию клеток, выделенных из легких иммунизированных мышей, стимулировали одним пептидом, соответствующим иммунодоминантному эпитопу NP366 [18]. В настоящем эксперименте с вакцинными штаммами сезонной ЖГВ подтипа H1N1 представлялось важным оценить субпопуляции TRM клеток к полному протеому эпидемического вируса гриппа, то есть при стимуляции иммунных клеток цельным живым вирусом H1N1/wt. В легких изучали фенотип лимфоцитов, продуцирующих интерферон в ответ на стимуляцию очищенным вирусом гриппа, в том числе оценивали экспрессию интерферонпродуцирующими клетками маркеров тканерезидентных клеток памяти CD69 и CD103. Лектин CD69 является классическим ранним маркером активации лимфоцитов благодаря своему быстрому появлению на поверхности плазматической мембраны после стимуляции, а также считается маркером тканевой локализации клеток за счет противодействия S1P1 рецептору, тем самым препятствуя выходу лимфоцитов в кровотоки [3, 14, 23]. Молекула CD103 представляет собой альфа-субъединицу интегрин $\alpha E\beta 7$, связывающегося с молекулой клеточной адгезии E-кадгерином, активно экспрессируемой эпителиальными клетками для поддержания целостности барьерных тканей. Соответственно, экспрессия маркера CD103 на TRM клетках способствует их удержанию в эпителиальном пласте [13, 24, 31].

Соответственно, на 7-е сутки после двукратной иммунизации вакцинными штаммами ЖГВ H1N1 6:2 и ЖГВ H1N1 5:3 у мышей выделяли клетки из тканей легких и стимулировали

цельным вирусом H1N1/wt с последующим выявлением вирусспецифических (то есть $IFN\gamma^+$) Т-клеток эффекторной памяти ($CD44^+CD62L^-$), экспрессирующих маркеры тканерезидентности ($CD69^+CD103^+$). Было показано, что T_{EM} клетки мышей, иммунизированных штаммом ЖГВ 5:3, имеют тенденцию к экспрессии более высоких уровней $IFN\gamma$ в ответ на стимуляцию цельным вирусом H1N1/wt, по сравнению с группой ЖГВ 6:2, что говорит о большей интенсивности клеточного ответа после иммунизации модифицированной вакциной (рис. 3А, Г). Эти данные указывают на более выраженную индукцию вирусспецифических Т-клеток памяти, локализующихся в легких мышей, при иммунизации вакцинным прототипом ЖГВ 5:3, по сравнению с классическим вариантом ЖГВ 6:2. Среди интерферон-продуцирующих Т-клеток эффекторной памяти более 70% экспрессировали маркер CD69 (рис. 3Б, Д). Кроме того, значительное количество $CD8^+CD69^+$ T_{EM} клеток несли маркер $CD103^+$, свидетельствующий о локализации данных клеток в барьерных тканях, в непосред-

ственной близости от потенциального места проникновения патогена (рис. 3Е).

Таким образом, в настоящем исследовании были получены подтверждающие экспериментальные свидетельства о перспективности модификации генома вакцинного штамма сезонной живой гриппозной вакцины с целью актуализации эпитопного состава вакцинных штаммов. Достаточно простой для практической реализации способ — замена гена нуклеопротеина с устаревшего (от донора аттенуации Лен/17) на актуальный (от эпидемического родительского вируса) — приводит к существенному повышению уровней вирусспецифических Т-клеток памяти, как на системном уровне, так и в тканях легких, что должно повысить эффективность вакцины в отношении циркулирующих вирусов гриппа. Также ранее была продемонстрирована безопасность вакцинных штаммов ЖГВ с формулой генома 5:3 с использованием разных животных моделей [7, 12, 21], что обосновывает перспективность их дальнейшего изучения в клинических исследованиях на добровольцах.

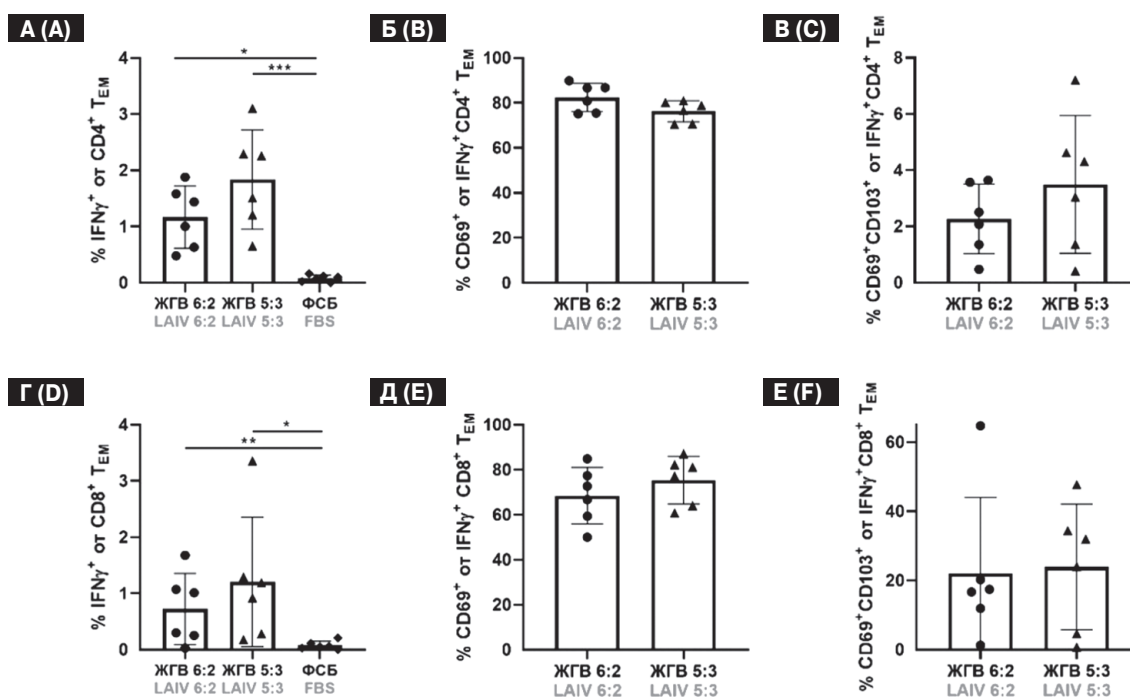


Рисунок 3. Уровни тканерезидентных $CD4^+$ (верхняя панель) и $CD8^+$ (нижняя панель) Т-клеток памяти у мышей, иммунизированных ЖГВ 6:2 и ЖГВ 5:3, а также получивших препарат плацебо (ФСБ)

Figure 3. Levels of tissue-resident $CD4^+$ (upper panel) and $CD8^+$ (lower panel) memory T cells in mice immunized with LAIV 6:2 and LAIV 5:3 as well as placebo treated (PBS)

Примечания. Количество клеток, экспрессирующих $IFN\gamma$ среди популяции $CD4^+$ (А) и $CD8^+$ (Г) Т-клеток эффекторной памяти ($CD44^+CD62L^-$) в образцах легких иммунизированных мышей. Второй столбец: представлена доля $CD69^+$ клеток среди соответствующих популяций (Б, Д). Третий столбец: доля $CD69^+CD103^+$ клеток (В, Е). Достоверные различия между группами (критерий Манна–Уитни) показаны на рисунках, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Notes. The number of cells expressing $IFN\gamma$ among $CD4^+$ (A) and $CD8^+$ (D) effector memory T cells ($CD44^+CD62L^-$) in lung samples from immunized mice. Column 2: the proportion of $CD69^+$ cells among the corresponding populations (B, E). Column 3: the proportion of $CD69^+CD103^+$ cells (C, F). Significant differences between the groups (Mann–Whitney criteria) are shown, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Список литературы/References

- Bodewes R., Geelhoed-Mieras M.M., Wrammert J., Ahmed R., Wilson P.C., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. In vitro assessment of the immunological significance of a human monoclonal antibody directed to the influenza A virus nucleoprotein. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2013, vol. 20, no. 8, pp. 1333–1337. doi: 10.1128/CVI.00339-13
- Burel J.G., Apte S.H., Groves P.L., McCarthy J.S., Doolan D.L. Polyfunctional and IFN- γ monofunctional human CD4(+) T cell populations are molecularly distinct. *JCI Insight*, 2017, vol. 2, no 3: e87499. doi: 10.1172/jci.insight.87499
- Cibrian D., Sanchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol.*, 2017, vol. 47, no. 6, pp. 946–953. doi: 10.1002/eji.201646837
- Deiss R.G., Arnold J.C., Chen W.J., Echols S., Fairchok M.P., Schofield C., Danaher P.J., McDonough E., Ridore M., Mor D., Burgess T.H., Millar E.V. Vaccine-associated reduction in symptom severity among patients with influenza A/H3N2 disease. *Vaccine*, 2015, vol. 33, no. 51, pp. 7160–7167. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.11.004
- Flynn J.A., Weber T., Cejas P.J., Cox K.S., Touch S., Austin L.A., Ou Y., Citron M.P., Luo B., Gindy M.E., Bahl K., Ciaramella G., Espeseth A.S., Zhang L. Characterization of humoral and cell-mediated immunity induced by mRNA vaccines expressing influenza hemagglutinin stem and nucleoprotein in mice and nonhuman primates. *Vaccine*, 2022, vol. 40, no. 32, pp. 4412–4423. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.03.063
- Godoy P., Romero A., Soldevila N., Torner N., Jane M., Martinez A., Cayla J.A., Rius C., Dominguez A., Working Group on Surveillance of Severe Influenza Hospitalized Cases in C. Influenza vaccine effectiveness in reducing severe outcomes over six influenza seasons, a case-case analysis, Spain, 2010/11 to 2015/16. *Euro Surveill.*, 2018, vol. 23, no. 43. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1700732
- Isakova-Sivak I., Stepanova E., Mezhenkaya D., Matyushenko V., Prokopenko P., Sychev I., Wong P.F., Rudenko L. Influenza vaccine: progress in a vaccine that elicits a broad immune response. *Expert Rev. Vaccines*, 2021, vol. 20, no. 9, pp. 1097–1112. doi: 10.1016/j.virol.2016.10.027
- Isakova-Sivak I., Korenkov D., Smolonogina T., Tretiak T., Donina S., Rekstin A., Naykhin A., Shcherbik S., Pearce N., Chen L.M., Bousse T., Rudenko L. Comparative studies of infectivity, immunogenicity and cross-protective efficacy of live attenuated influenza vaccines containing nucleoprotein from cold-adapted or wild-type influenza virus in a mouse model. *Virology*, 2017, vol. 500, pp. 209–217. doi: 10.1080/14760584.2021.1964961
- 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
- Jegaskanda S., Co M.D.T., Cruz J., Subbarao K., Ennis F.A., Terajima M. Induction of H7N9-Cross-Reactive Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Antibodies by Human Seasonal Influenza A Viruses that are Directed Toward the Nucleoprotein. *J. Infect. Dis.*, 2017, vol. 215, no. 5, pp. 818–823. doi: 10.1093/infdis/jiw629
- Kang S., Brown H.M., Hwang S. Direct Antiviral Mechanisms of Interferon-Gamma. *Immune Netw*, 2018, vol. 18, no. 5: e33. doi: 10.4110/in.2018.18.e33
- Korenkov D.A., Laurie K.L., Reading P.C., Carolan L.A., Chan K.F., Isakova-Sivak I.I., Smolonogina T.A., Subbarao K., Barr I.G., Villanueva J., Shcherbik S., Bousse T., Rudenko L.G. Safety, immunogenicity and protection of A(H3N2) live attenuated influenza vaccines containing wild-type nucleoprotein in a ferret model. *Infect. Genet. Evol.*, 2018, vol. 64, pp. 95–104. doi: 10.1016/j.meegid.2018.06.019
- Lee Y.-T., Suarez-Ramirez J.E., Wu T., Redman J.M., Bouchard K., Hadley G.A., Cauley L.S. Environmental and antigen receptor-derived signals support sustained surveillance of the lungs by pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.*, 2011, vol. 85, no. 9, pp. 4085–4094. doi: 10.1128/JVI.02493-10
- Mackay L.K., Braun A., Macleod B.L., Collins N., Tebartz C., Bedoui S., Carbone F.R., Gebhardt T. Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. *J. Immunol.*, 2015, vol. 194, no. 5, pp. 2059–2063. doi: 10.4049/jimmunol.1402256
- Makedonas G., Betts M.R. Polyfunctional analysis of human t cell responses: importance in vaccine immunogenicity and natural infection. *Springer Semin. Immunopathol.*, 2006, vol. 28, no. 3, pp. 209–219. doi: 10.1007/s00281-006-0025-4
- Okoli G.N., Racovitan F., Abdulwahid T., Hyder S.K., Lansbury L., Righolt C.H., Mahmud S.M., Nguyen-Van-Tam J.S. Decline in Seasonal Influenza Vaccine Effectiveness With Vaccination Program Maturation: A Systematic Review and Meta-analysis. *Open Forum Infect. Dis.*, 2021, vol. 8, no. 3: ofab069. doi: 10.1093/ofid/ofab069
- Osterholm M.T., Kelley N.S., Sommer A., Belongia E.A. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.*, 2012, vol. 12, no. 1, pp. 36–44. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70295-X
- Prokopenko P., Matyushenko V., Rak A., Stepanova E., Chistyakova A., Goshina A., Kudryavtsev I., Rudenko L., Isakova-Sivak I. Truncation of NS1 Protein Enhances T Cell-Mediated Cross-Protection of a Live Attenuated Influenza Vaccine Virus Expressing Wild-Type Nucleoprotein. *Vaccines*, 2023, vol. 11, no. 3: 501. doi: 10.3390/vaccines11030501
- Rak A., Isakova-Sivak I., Rudenko L. Nucleoprotein as a Promising Antigen for Broadly Protective Influenza Vaccines. *Vaccines*, 2023, vol. 11, no. 12: 1747. doi: 10.3390/vaccines11121747
- 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
- Rekstin A., Isakova-Sivak I., Petukhova G., Korenkov D., Losev I., Smolonogina T., Tretiak T., Donina S., Shcherbik S., Bousse T., Rudenko L. Immunogenicity and Cross Protection in Mice Afforded by Pandemic H1N1 Live Attenuated Influenza Vaccine Containing Wild-Type Nucleoprotein. *Biomed. Res. Int.*, 2017, vol. 2017: 9359276. doi: 10.1155/2017/9359276
- Schmidt A., Lapuente D. T Cell Immunity against Influenza: The Long Way from Animal Models Towards a Real-Life Universal Flu Vaccine. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 2: 199. doi: 10.3390/v13020199

23. Skon C.N., Lee J.-Y., Anderson K.G., Masopust D., Hogquist K.A., Jameson S.C. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat. Immunol.*, 2013, vol. 14, no. 12, pp. 1285–1293. doi: 10.1038/ni.2745
24. Szabo P.A., Miron M., Farber D.L. Location, location, location: Tissue resident memory T cells in mice and humans. *Sci. Immunol.*, 2019, vol. 4, no. 34. doi: 10.1126/sciimmunol.aas9673
25. Takamura S. Persistence in Temporary Lung Niches: A Survival Strategy of Lung-Resident Memory CD8(+) T Cells. *Viral Immunol.*, 2017, vol. 30, no. 6, pp. 438–450. doi: 10.1089/vim.2017.0016
26. Topham D.J., Reilly E.C. Tissue-Resident Memory CD8(+) T Cells: From Phenotype to Function. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 515. doi: 10.3389/fimmu.2018.00515
27. Vanderven H.A., Ana-Sosa-Batiz F., Jegaskanda S., Rockman S., Laurie K., Barr I., Chen W., Wines B., Hogarth P.M., Lambe T., Gilbert S.C., Parsons M.S., Kent S.J. What Lies Beneath: Antibody Dependent Natural Killer Cell Activation by Antibodies to Internal Influenza Virus Proteins. *EBioMedicine*, 2016, vol. 8, pp. 277–290. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.04.029
28. Virelizier J.L., Allison A.C., Oxford J.S., Schild G.C. Early presence of ribonucleoprotein antigen on surface of influenza virus-infected cells. *Nature*, 1977, vol. 266, no. 5597, pp. 52–54. doi: 10.1038/266052a0
29. Wang W.C., Sayedahmed E.E., Sambhara S., Mittal S.K. Progress towards the development of a universal influenza vaccine. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 8: 1684. doi: 10.3390/v14081684
30. Wheelock E.F. Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. *Science*, 1965, vol. 149, no. 3681, pp. 310–311. doi: 10.1126/science.149.3681.310
31. Zhong W., Liu F., Dong L., Lu X., Hancock K., Reinherz E.L., Katz J.M., Sambhara S. Significant impact of sequence variations in the nucleoprotein on CD8 T cell-mediated cross-protection against influenza A virus infections. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 5: e10583. doi: 10.1371/journal.pone.0010583

Авторы:

Прокопенко П.И., младший научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Степанова Е.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Матюшенко В.А., научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Чистякова А.К., лаборант-исследователь отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Костромитина А.Д., лаборант-исследователь отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Котомина Т.С., научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Рак А.Я., к.б.н., старший научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Рубинштейн А.А., младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Кудрявцев И.В., к.б.н., зав. лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Новицкая В.В., лаборант-исследователь отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Руденко Л.Г., д.м.н., профессор, зав. отделом вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Исакова-Сивак И.Н., член-корреспондент РАН, д.б.н., зав. лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Prokopenko P.I., Junior Researcher, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Stepanova E.A., PhD (Biology), Leading Researcher, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Matyushenko V.A., Researcher, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Chistyakova A.K., Research Laboratory Assistant, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Kostromitina A.D., Research Laboratory Assistant, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Kotomina T.S., Researcher, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Rak A.Ya., PhD (Biology), Senior Researcher, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Rubinstein A.A., Junior Researcher, Cell Immunology Laboratory, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head of the Cell Immunology Laboratory, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Novitskaya V.V., Research Laboratory Assistant, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Rudenko L.G., DSc (Medicine), Professor, Head of A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Isakova-Sivak I.N., RAS Corresponding Member, DSc (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Prevention of Viral Infections, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

ВЫЯВЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К НЕКОТОРЫМ ФЛАВИВИРУСАМ У НАСЕЛЕНИЯ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

Е.И. Кривошеина¹, М.Ю. Карташов¹, Е.В. Найденова², Н.Д. Ушкаленко¹, К.А. Свирин¹,
М.Б. Ба³, И. Нурдин⁴, С. Бумбали⁴, В.А. Терновой¹

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

² ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия

³ Исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, г. Киндия, Гвинейская Республика

⁴ Вирусологический исследовательский центр, г. Конакри, Гвинейская Республика

Резюме. Одними из самых распространенных арбовирусов в мире являются представители рода *Orthoflavivirus* (семейство *Flaviviridae*). На территории Гвинейской Республики подтверждена циркуляция таких представителей данного семейства, как вирус желтой лихорадки (ВЖЛ), вирус Западного Нила (ВЗН) и вирус денге (ВД). Цель исследования — определение уровня специфических антител класса IgG к ВЖЛ, ВД и ВЗН у жителей различных ландшафтно-географических зон Гвинейской Республики методом ИФА. *Материалы и методы.* Для исследования была составлена панель из 1559 сывороток крови практически здоровых людей, которые были собраны во всех ландшафтно-географических зонах Гвинейской Республики. Выявление специфических антител класса IgG к ВД и ВЗН осуществляли коммерческими диагностическими препаратами, а к ВЖЛ — экспериментальной ИФА тест-системой, основанной на аналоге третьего домена белка Е полученного в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. *Результаты.* При тестировании сывороток крови в 28,5% (95% ДИ: 26,3–30,7) случаев были обнаружены антитела IgG к ВЖЛ, к ВД — в 11,8%, (95% ДИ: 10,3–13,5) и к ВЗН — в 27,0% (95% ДИ: 24,8–29,3). Антитела одновременно к трем вирусам (ВЖЛ, ВД и ВЗН) были выявлены в 30 случаях, к ВЖЛ и ВД — 14, ВЖЛ и ВЗН — 44, ВД и ВЗН — 56. *Выводы.* Выявление антител к ВЗН и ВД подтверждает факт продолжающейся циркуляции данных возбудителей на территории Гвинейской Республики, что несет риск здоровью местному населению. Детальное изучение молекулярно-генетических и антигенных свойств флавивирусов, циркулирующих на данной территории, позволит разработать более специфичные средства диагностики.

Ключевые слова: флавивирусы, иммунная прослойка, антитела класса IgG, вирус желтой лихорадки, вирус Западного Нила, вирус денге, Гвинейская Республика.

Адрес для переписки:

Кривошеина Екатерина Ильинична
630559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово, 6Б-61,
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.
Тел.: 8 913 919-10-59.
E-mail: katr962@mail.ru

Contacts:

Ekaterina I. Krivosheina
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo, 6B-61,
State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector".
Phone: +7 913 919-10-59.
E-mail: katr962@mail.ru

Для цитирования:

Кривошеина Е.И., Карташов М.Ю., Найденова Е.В., Ушкаленко Н.Д.,
Свирин К.А., Ба М.Б., Нурдин И., Бумбали С., Терновой В.А. Выявление
специфических антител класса IgG к некоторым флавивирусам
у населения Гвинейской Республики // Инфекция и иммунитет. 2024.
Т. 14, № 2. С. 381–386. doi: 10.15789/2220-7619-IOS-15081

Citation:

Krivosheina E.I., Kartashov M.Yu., Naidenova E.V., Ushkalenko N.D.,
Svirin K.A., Bah M.B., Nouridine I., Boumbaly S., Ternovoy V.A. Identification
of specific IgG class antibodies to certain flaviviruses in the population
of the Republic of Guinea // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 381–386. doi: 10.15789/2220-
7619-IOS-15081

IDENTIFICATION OF SPECIFIC IgG CLASS ANTIBODIES TO CERTAIN FLAVIVIRUSES IN THE POPULATION OF THE REPUBLIC OF GUINEA

Krivosheina E.I.^a, Kartashov M.Yu.^a, Naidenova E.V.^b, Ushkalenko N.D.^a, Svirin K.A.^a, Bah M.B.^c, Nouridine I.^d, Boumbaly S.^d, Ternovoy V.A.^a

^a State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

^b Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

^c Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea

^d Hemorrhagic Fevers Virology Research Center, Conakry, Republic of Guinea

Abstract. One of the most common arboviruses in the world are representatives of the genus *Orthoflavivirus* (family *Flaviviridae*). On the territory of the Republic of Guinea, the circulation of such representatives of this family as the yellow fever virus (YFV), West Nile virus (WNV) and dengue virus (DENV) has been confirmed. The aim of the study was to determine the level of specific IgG class antibodies to YFV, DENV and WNV in residents of various landscape–geographical zones of the Republic of Guinea by the ELISA method. *Materials and methods.* For the study, a panel of 1559 blood serums from practically healthy people was compiled, which were collected in all landscape and geographical zones of the Republic of Guinea. The detection of specific IgG class antibodies to DENV and WNV was carried out with commercial diagnostic drugs, and for YFV — with an experimental ELISA test system based on an analogue of the third domain of protein E obtained at the State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector” of Rospotrebnadzor. *Results.* When testing blood sera in 28.5% (95% CI: 26.3–30.7) of cases, IgG antibodies to YFV, to DENV — in 11.8%, (95% CI: 10.3–13.5) and to WNV — in 27.0% (95% CI: 24.8–29.3) were detected. Antibodies to three viruses simultaneously (YFV, DENV and WNV) were detected in 30 cases, to YFV and DENV — 14, YFV and WNV — 44, DENV and WNV — 56. *Conclusion.* The detection of antibodies to WNV and DENV confirms the fact of the continued circulation of these pathogens in the territory of the Republic of Guinea, which poses a health risk to the local population. A detailed study of the molecular genetic and antigenic properties of flaviviruses circulating in this area will allow the development of more specific diagnostic tools.

Key words: *flaviviruses, immune layer, IgG class antibodies, yellow fever virus, West Nile virus, dengue virus, Republic of Guinea.*

Введение

Из обширной экологической группы арбовирусов представители рода *Orthoflavivirus* (семейство *Flaviviridae*), циркуляция которых доказана на всех континентах, исключая Антарктиду, имеют наибольшее эпидемиологическое значение. Африка входит состав регионов, в наибольшей степени затронутых проблемой распространения инфекционных болезней, вызываемых флавивирусами, включая желтую лихорадку и лихорадку денге.

По данным ВОЗ в 2023 г. в африканских странах зарегистрирован 171 991 случай заболевания лихорадкой денге, в том числе 753 — с летальным исходом. Циркуляция вирусов денге выявлена в более чем 30 африканских странах [2].

Подходящие климатические условия, наличие большого количества членистоногих переносчиков (прежде всего комаров родов *Aedes* и *Culex*), низкая осведомленность населения и медицинского персонала о профилактике и контроле за инфекционными болезнями, вызываемыми флавивирусами, является актуальной проблемой для здравоохранения многих африканских стран, в том числе и Гвинейской Республики. Территория страны условно делится на четыре ландшафтно-географические зоны: Нижняя, Средняя, Верхняя и Лесная Гвинея, где в разные годы рядом авторов подтверждена циркуляция вирусов желтой лихорадки (ВЖЛ), Западного Нила (ВЗН) и денге (ВД) [1, 6]. Последние подтвержденные три

случая заболевания людей желтой лихорадкой в Гвинее были зарегистрированы в конце 2023 г. Заболевшими оказались 6-летняя девочка из региона Фарана (Средняя Гвинея), 7-летний мальчик из округа Кундара (Нижняя Гвинея) и 60-летняя женщина из Гекеду (Лесная Гвинея) [3]. Четких и достоверных данных о заболеваемости населения другими инфекционными болезнями, вызываемыми флавивирусами, на территории Гвинеи нет. Имеются единичные публикации о выявлении случая лихорадки денге [5].

Для достоверной оценки наличия иммунной прослойки к возбудителям инфекционных болезней, вызываемых арбовирусами, необходимым является определение уровня специфических антител в сыворотках крови людей, проживающих на данной территории [8].

Цель настоящей работы состояла в изучении уровня специфических антител класса IgG к ВЖЛ, ВД и ВЗН у местного населения в разных ландшафтно-географических зонах Гвинейской Республики методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Материалы и методы

Исследование проводилось совместно российскими и гвинейскими специалистами на базе Российско-Гвинейского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней в г. Киндия, Гвинейская Республика, в 2020–2023 гг. [7].

Исследуемые сыворотки. Для работы были использованы сыворотки крови практически здоровых жителей различных ландшафтно-географических зон Гвинейской Республики. Исследование проводилось при информированном согласии участников. Протокол одобрен решением Этического комитета Гвинейской Республики (№ 129/CNERS/16 от 31 августа 2015 г.).

На территории Гвинейской Республики широко распространены возбудители малярии, в связи с чем весь полученный материал перед исследованием был протестирован методом иммунохроматографического анализа для выявления антигенов малярийных плазмодиев с использованием наборов реагентов MalariaAgP.f/Pan SD BIOLINE (Standart Diagnostics, Inc., Республика Южная Корея). Образцы, в которых присутствовали антигены возбудителей малярии, в последующую работу не поступили с целью исключения получения неспецифических результатов. Таким образом, была составлена панель из 1559 сывороток крови условно здоровых жителей Гвинейской Республики (табл.). Исследуемая выборка респондентов была представлена в возрастном диапазоне от 1 до 89 лет; в исследование вошло 910 женщин (58,4%) и мужчин 649 (41,6%).

Твердофазный ИФА. Сыворотки крови исследовали методом ИФА, направленным на выявление вирусоспецифических антител класса IgG к ВЖЛ, ВД и ВЗН. В работе были использованы коммерческие диагностические препараты: «Anti-Denge Virus ELISA (IgG)» (Euroimmun, Германия) и «БиоСкрин-ВЗН (Комплект G)» (Биосервис, Россия). Для выявления антител класса IgG к вирусу ЖЛ был взят экспериментальный на-

бор реагентов, разработанный в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Основой данного теста служит рекомбинантный очищенный белок Е ВЖЛ, который сорбирован в карбонатном буфере (Na₂CO₃ и NaN₃, pH 9,6) на полистироловые планшеты (NEST, США). На рекомбинантную плазмидную ДНК, экспрессирующую аналог третьего домена поверхностного белка Е ВЖЛ в бактериальной системе *E. coli* (BL-21(DE3)), получен патент на изобретение № RU2798563 С1 («Рекомбинантная плазмидная ДНК рЕТ160-Е3-УФV, экспрессирующая аналог третьего домена поверхностного белка Е вируса желтой лихорадки (ВЖЛ) в бактериальной системе *E. coli*, используемого для выявления специфических антител ВЖЛ»). Твердофазный ИФА для выявления антител IgG к ВЖЛ проводили, как было описано авторами в предыдущих публикациях [4].

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программного обеспечения Microsoft Excel, диаграмма Венна была построена с помощью программы Microsoft PowerPoint. Средние значения оценивали с учетом 95% доверительного интервала (ДИ) по методу Клоппера–Пирсона в онлайн-сервисе Epitools (<https://epitools.ausvet.com.au>).

Результаты

При тестировании панели сывороток крови в 715 (45,9% от общего количества) случаев были выявлены специфические антитела класса IgG по крайней мере к одному из изучаемых флавивирусов. Чаще всего исследуемые сыворотки содержали вирусоспецифические антитела

Таблица. Результаты выявления специфических антител класса IgG к некоторым флавивирусам в различных ландшафтно-географических зонах Гвинейской Республики

Table. Detection of flavivirus-specific IgG antibodies in various landscape and geographical zones of the Republic of Guinea

Ландшафтно-географическая зона Landscape and geographical zones	Общее количество исследованных образцов, n Total number of tested samples, n	Вирусы/Viruses		
		Результаты выявления антител класса IgG: абсолютное число положительных проб, n; доля положительных проб, % Detection of IgG antibodies: absolute number of positive samples, n; proportion of positive samples, %		
		ВЖЛ/YFV	ВД/DENV	ВЗН/WNV
Нижняя Гвинея Lower Guinea	807	299; 37,05 (95% ДИ: 33,8–40,4)	58; 7,19 (95% ДИ: 5,6–9,2)	141; 17,47 (95% ДИ: 15,1–20,2)
Средняя Гвинея Middle Guinea	342	41; 11,89 (95% ДИ: 8,9–15,8)	47; 13,74 (95% ДИ: 10,5–17,8)	124; 36,26 (95% ДИ: 31,3–41,5)
Верхняя Гвинея Upper Guinea	121	64; 52,89 (95% ДИ: 44,1–61,5)	30; 24,79 (95% ДИ: 17,9–33,2)	44; 36,36 (95% ДИ: 28,3–45,2)
Лесная Гвинея Forested Guinea	289	40; 13,84 (95% ДИ: 10,3–18,3)	49; 16,96 (95% ДИ: 13,1–21,7)	112; 38,75 (95% ДИ: 33,3–44,5)
Итого по всей территории Гвинеи Total Guinea-wide	1559	444; 28,48 (95% ДИ: 26,3–30,7)	184; 11,8 (95% ДИ: 10,3–13,5)	421; 27 (95% ДИ: 24,8–29,3)

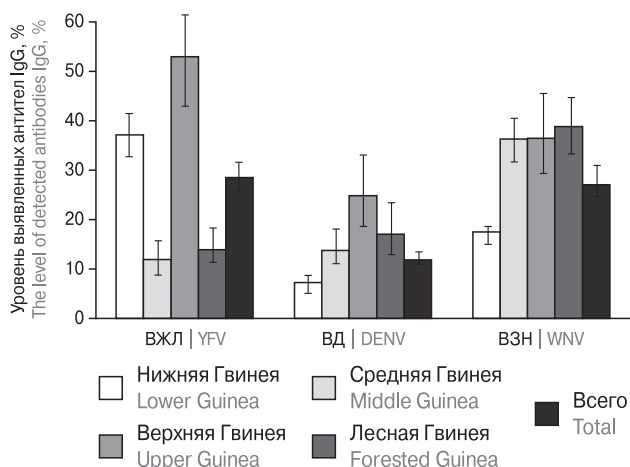


Рисунок 1. График распределения специфических антител класса IgG к флавивирусам в разных ландшафтно-географических зонах Гвинейской Республики
 Figure 1. Distribution of flavivirus-specific IgG antibodies in different landscape-geographical zones of the Republic of Guinea

к ВЖЛ (28,48%, (95% ДИ: 26,3–30,7)). Что касается положительные результатов в отношении остальных флавивирусов, то к ВД специфические антитела были обнаружены в 184 (11,8%, (95% ДИ: 10,3–13,5)) случаях, а к ВЗН — в 421 (27%, (95% ДИ: 24,8–29,3)) (табл.).

Распределение положительных проб по разным ландшафтно-географическим зонам Гвинейской Республики представлено на рис. 1 и в табл.

Стоит обратить внимание, что при анализе сывороток крови, были выявлены образцы, в которых детектировались вирусоспецифические антитела IgG ко всем трем флавивирусам или к двум из них. Так, антитела одновременно к трем вирусам (ВЖЛ, ВД и ВЗН) были выявлены в 30 случаях, к ВЖЛ и ВД — 14, ВЖЛ и ВЗН — 44, ВД и ВЗН — 56 (рис. 2).

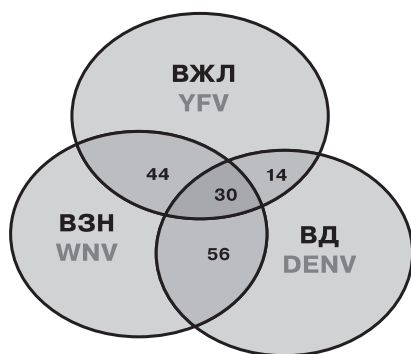


Рисунок 2. Количество образцов, в которых выявлены специфические антитела IgG к нескольким флавивирусам
 Figure 2. Number of samples positive for two or more flavivirus-specific IgG antibodies

Обсуждение

На территории Гвинейской Республики один из самых высоких уровней антител класса IgG у местных жителей регистрировался в отношении ВЖЛ (28,48% от всех исследованных сывороток). Это можно объяснить тем, что в разные годы во время вспышек ЖЛ проводились кампании по массовой вакцинации [15]. Причем, в зоне Нижней и Верхней Гвинеи процент положительных образцов был достаточно высоким, и составлял 37,5% и 52,89% соответственно. Несмотря на определение, достаточно высокого уровня иммунной прослойки населения к возбудителю ЖЛ, он явно не является достаточным в случае возникновения крупной вспышки болезни. Так, по данным ВОЗ для формирования стойкого коллективного иммунитета против ЖЛ необходимо наличие специфических антител к возбудителю в сыворотках крови не менее 80% местного населения [11].

При сравнении уровня антител к ВЖЛ среди мужчин и женщин достоверных различий выявлено не было; IgG были обнаружены у 28,1% (95% ДИ: 24,7–31,6) мужчин и 28,8% (95% ДИ: 25,9–31,8) — женщин. Однако при анализе различных возрастных групп удалось выявить различия. Наибольший уровень антител наблюдался в возрастной группе до 20 лет — 36,8% (95% ДИ: 32,4–41,5) и старшей возрастной группе (старше 60 лет) — 94,7% (95% ДИ: 89,5–97,4), в то время как этот показатель в группах от 21 до 40 лет составил всего 14,3% (95% ДИ: 11,9–17,1), а от 41 до 60 лет — 21,4% (95% ДИ: 17,0–26,6).

Известно, что вакцинация против ЖЛ проводится в рамках нескольких программ: плановая иммунизация детей (нацеленная на младенцев до 9 месяцев) в эндемичных регионах; кампании по реагированию на вспышки ЖЛ; а также вакцинация людей, направляющихся в эндемичные по ЖЛ страны. Согласно отчетам ВОЗ, в Республике Гвинея самый высокий охват вакцинацией против ЖЛ наблюдается у людей старше 60 лет (порядка 80–90%). У людей с 14 до 59 лет уровень вакцинации на уровне 60–70%, а у детей до 13 лет всего 40–50% [14]. Данные настоящей работы полностью подтверждают эти сведения.

Уровень вирусоспецифических антител к ВЗН в разных ландшафтно-географических зонах составил от 17,47 до 38,75%. Такой высокий процент положительных образцов, при отсутствии официальных данных о заболеваемости лихорадкой Западного Нила, может быть связан с тем, что при заражении вирусом человек часто переносит болезнь бессимптомно или, при наличии симптоматики, без диффе-

рнциального лабораторного исследования [10]. Стоит отметить, что самый высокий уровень антител к ВЗН (38,75%) наблюдается в районе Лесной Гвинеи. Эти данные согласуются с опубликованными ранее исследованиями [1,6].

Что касается ВД, то антитела к нему обнаруживались в 7,9–24,79% случаях во всех ландшафтно-географических зонах, что соответствует тому, что комары рода *Aedes*, которые являются основными переносчиками возбудителя, распространены по всей территории Гвинейской Республики [1]. Следовательно, риск заболевания лихорадкой денге имеют все население страны.

Обнаружение антител в сыворотке крови сразу к нескольким исследуемым вирусам может свидетельствовать и о недостаточной специфичности наборов реагентов, направленных на выявление антител IgG к флавивирусам. Серологический перекрест является известной проблемой при изучении распространения ВД, ВЖЛ и ВЗН, имеющие схожие по аминокислотному составу антигены [13]. Следовательно, антитела, образованные в ответ на встречу макроорганизма с одним из флавивирусов, могут кросс-реагировать с возбудителями других представителей семейства, что затрудняет точную идентификацию серологическими методами [12]. Важно отметить, что для достоверной постановки диагноза в данном случае требуется комплексный подход, включающий как изучение клинической симптоматики, эпидемиологический анамнез, так и результаты различных лабораторных тестов, включая серологические и молекулярно-генетические методы.

Еще одной из причин обнаружения специфических антител сразу к нескольким флавивирусам может являться то, что жители Гвинеи за период жизни могут взаимодействовать с несколькими видами возбудителей.

Заключение

Таким образом, специфические антитела класса IgG к ВЖЛ были обнаружены в 28,5% (95% ДИ: 26,3–30,7) исследуемых проб. Встречаемость антител к ВД в исследуемой выборке составила 11,8%, (95% ДИ: 10,3–13,5), а к ВЗН — 27% (95% ДИ: 24,8–29,3).

В 2017 г. специалистами ВОЗ разработана и запущена стратегия по ликвидации эпидемий желтой лихорадки (Eliminate Yellow fever Epidemics, EYE), которую поддерживают медицинские организации 40 стран Африки, Северной и Южной Америки, подвергающихся риску распространения данной инфекционной болезни. Цель такого партнерства — массовая вакцинация населения, проживающего в эндемичных регионах, своевременное выявление случаев ЖЛ и принятие соответствующих мер для ликвидации возможных вспышек. Согласно прогнозам ВОЗ, к 2026 г. более миллиарда человек должны принять участие в этой программе [9]. Возможно, благодаря этой инициативе, уровень коллективного иммунитета к ЖЛ достигнет необходимого уровня, чтобы не допустить распространения желтой лихорадки на территории Гвинейской Республики в будущем.

Выявление специфических антител класса IgG к ВЗН и ВД в настоящем исследовании подтверждает факт продолжающейся циркуляции данных возбудителей на территории Гвинейской Республики, что, несомненно, несет риск здоровью местного населения. А более детальное изучение молекулярно-генетических и серологических особенностей флавивирусов, циркулирующих в данном регионе, позволит разработать более совершенные средства лабораторной диагностики вызываемых ими инфекционных болезней.

Список литературы/References

1. Бутенко А.М. Изучение циркуляции арбовирусов в Гвинейской Республике // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1996. № 2. С. 40–45. [Butenko A.M. Study of the circulation of arboviruses in the Republic of Guinea. *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 1996, no. 2, pp. 40–45. (In Russ.)]
2. Всемирная организация здравоохранения. Денге — ситуация в мире. 21 декабря 2023 г. [World Health Organisation. Dengue — world situation. December, 21, 2023.] URL: <https://www.who.int/ru/emergencies/diseaseoutbreaknews/item/2023-DON498> (24.04.2024)
3. Всемирная организация здравоохранения. Новости о вспышках болезней — Гвинея. 23 декабря 2020 г. [World Health Organisation. Disease outbreak news — Guinea. December, 23, 2020.] URL: <https://www.who.int/ru/emergencies/disease-outbreak-news/item/2020-DON302> (23.04.2024)
4. Кривошеина Е.И., Карташов М.Ю., Найденова Е.В., Ушкаленко Н.Д., Пьянков С.А., Терновой В.А., Локтев В.Б. Разработка способа выявления специфических антител к белку Е вируса желтой лихорадки (Flaviviridae: Flavivirus) методом иммуноферментного анализа // Вопросы вирусологии. 2022. Т. 67, № 4. С. 341–350. [Krivosheina E.I., Kartashov M.Yu., Naidenova E.V., Ushkalenko N.D., Pyankov S.A., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Development of a method for detection of specific antibodies to E protein of yellow fever virus (Flaviviridae: Flavivirus) by enzyme immunoassay. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2022, vol. 67, no. 4, pp. 341–350. (In Russ.)] doi: doi: 10.36233/0507-4088-123
5. Мальцев О.В., Касьяненко К.В., Жданов К.В., Малышев Н.А., Коломоец Е.В., Коному В.К. Опыт применения противовирусного препарата риамиловир у пациента с лихорадкой денге в Гвинейской Республике (клинический случай) // Терапевтический архив. 2023. Т. 95, № 1. С. 85–89. [Maltsev O.V., Kasyanenko K.V., Zhdanov K.V., Malyshev N.A., Kolomoets E.V., Konomou V.K. The experience in treatment of dengue fever using antiviral drug riamilovir in the Republic of Guinea (case report). *Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic Archive*, 2023, vol. 95, no. 1, pp. 85–89 (In Russ.)]

6. Найденова Е.В., Карташов М.Ю., Захаров К.С., Шевцова А.П., Диалло М.Г., Нурдин И., Ба М.Б., Бумбали С., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Определение уровня иммунной прослойки населения Гвинеи к некоторым арбовирусам // Вопросы вирусологии. 2021. Т. 66, № 5. С. 346–353. [Naidenova E.V., Kartashov M.Y., Zakharov K.S., Shevtsova A.P., Diallo M.G., Nouridine I., Bah M.B., Boumbaly S., Shcherbakova S.A., Kuttyrev V.V. Study of the prevalence of antibodies to some arboviruses in the population of the Republic of Guinea. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2021, vol. 66, no. 5, pp. 346–353. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-74
7. Найденова Е.В., Лопатин А.А., Сафронов В.А., Коломоец Е.В., Левковский А.Е., Силла А.Л., Старшинов В.А., Щербакова С.А., Малеев В.В. Обеспечение биологической безопасности при проведении противоэпидемических мероприятий в период ликвидации эпидемии лихорадки Эбола в Гвинеи // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018. Т. 7, № 3. С. 102–108. [Naydenova E.V., Lopatin A.A., Safronov V.A., Kolomoets E.V., Levkovskiy A.E., Silla A.L., Starshinov V.A., Shcherbakova S.A., Maleev V.V. Biological safety at carrying out anti-epidemic measures during the liquidation of the epidemic Ebola fever in the Republic of Guinea. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2018, vol. 7, no. 3, pp. 102–108. (In Russ.)] doi: 10.24411/2305-3496-2018-13015
8. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Под ред. Д.К. Львова. М.: МИА, 2013. 1200 с. [Handbook of virology. Viruses and viral infections of humans and animals. Ed. Lvov D.K. *Moscow: Medical Information Agency*, 2013. 1200 p. (In Russ.)]
9. A global strategy to Eliminate Yellow fever Epidemics 2017–2026. *Geneva: World Health Organization*, 2018. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272408/9789241513661-eng.pdf>
10. Domingo C., Charrel R.N., Schmidt-Chanasit J., Zeller H., Reusken C. Yellow fever in the diagnostics laboratory. *Emerg. Microbes Infect.*, 2018, vol. 7, no. 1: 129. doi: 10.1038/s41426-018-0128-8
11. International Federation of Red Cross. GIN: Epidemic — 2023-01 — Yellow Fever. URL: <https://go.ifrc.org/emergencies/6331> (24.04.2024)
12. Lorch M.S., Collado M.S., Argüelles M.H., Rota R.P., Spinsanti L.I., Lozano M.E., Goñi S.E. Production of recombinant NS1 protein and its possible use in encephalitic flavivirus differential diagnosis. *Protein Expr. Purif.*, 2019, vol. 153, pp. 18–25. doi: 10.1016/j.pep.2018.08.008
13. Rathore A.P.S., St John A.L. Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses. *Front. Immunol.*, 2020, no. 11: 334. doi: 10.3389/fimmu.2020.00334
14. Yellow fever death reported in Guinea. URL: <http://outbreaknewstoday.com/yellow-fever-death-reported-in-guinea-58662> (24.04.2024)
15. Yellow fever in Africa and Central and South America, 2008–2009. *Wkly Epidemiol. Rec.*, 2011, vol. 86, no. 4, pp. 25–36.

Авторы:

Кривошеина Е.И., научный сотрудник отдела разработки и производства средств диагностики вирусных заболеваний ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Карташов М.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Найденова Е.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела диагностики инфекционных болезней ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Ушкаленко Н.Д., младший научный сотрудник отдела разработки и производства средств диагностики вирусных заболеваний ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Свиринов К.А., младший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Ба М.Б., научный сотрудник Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи, г. Киндия, Гвинеи Республика;

Нурдин И., к.б.н., научный сотрудник Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи, г. Киндия, Гвинеи Республика;

Бумбали С., к.б.н., директор лаборатории вирусных геморрагических лихорадок Вирусологического исследовательского центра, г. Конакри, Гвинеи Республика;

Терновой В.А., к.б.н., врио зав. отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия.

Authors:

Krivosheina E.I., Researcher, Department of Development and Production of Diagnostic Tools for Viral Diseases, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Kartashov M.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Naidenova E.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Department of Infectious Diseases Diagnostics, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

Ushkalenko N.D., Junior Researcher, Department of Development and Production of Diagnostic Tools for Viral Diseases, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Svirin K.A., Junior Researcher, Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Bah M.B., Researcher, Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea;

Nouridine I., PhD (Biology), Researcher, Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea;

Boumbaly S., PhD (Biology), Director of the Laboratory of Viral Hemorrhagic Fevers Virology Research Center, Conakry, Republic of Guinea;

Ternovoi V.A., PhD (Biology), Acting Head of the Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation.

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИАЛЛИЛАМИНА В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ ГРИППА И ОРВИ В РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

Н.А. Контаров^{1,2}, А.А. Бахромеева², Е.И. Долгова², И.В. Погарская², Е.О. Контарова³,
Н.В. Юминова²

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

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

³ ФНКЦ Федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства (Больница № 83), Москва, Россия

Резюме. Острые респираторные вирусные инфекции, в том числе грипп, образуют наиболее распространенную группу сезонных вирусных инфекций. Грипп представляет наиболее распространенную и опасную вирусную инфекцию. Вакцинопрофилактика — единственный на сегодняшний день способ управления гриппозной инфекцией. При этом в отношении инфекций, вызываемых парагриппом и респираторно-синцитиальным вирусом, существует только симптоматическое лечение. Вирус гриппа достаточно быстро уходит от вакцинального пресса, благодаря высокой способности к антигенному дрейфу и реассортации фрагментов генома. Имеющиеся на сегодняшний день противовирусные препараты довольно быстро теряют эффективность, в особенности, по отношению к высококонтагиозным штаммам вируса гриппа. Существует необходимость создания химиопрепарата с комплексным действием в отношении всех структур вириона: поверхностных белков, липидной мембраны и рибонуклеопротеида. К таким химиопрепаратам можно отнести полиэлектролиты (ПЭ), в частности, полиаллиламин (ПАА), который показал выраженное вирусингибирующее действие в сочетании с низкой цитотоксичностью в отношении нескольких штаммов вируса гриппа в культуре клеток MDCK и вируса кори в культуре клеток Vero. В продолжении наших предыдущих исследований проведено расширенное изучение противовирусной активности и цитотоксичности ПАА для трех штаммов вируса гриппа в клеточной линии A549, вируса парагриппа 3-го типа (HPIV-3) и респираторно-синцитиального вируса (RSV) в клеточных линиях A549, HEp-2, Vero, L-41, MA-104. **Результаты.** Было показано, что наиболее чувствительными к действию ПАА оказались вирусы гриппа и RSV, активность которых снижалась в клетках карциномы легкого человека A549 на 3 порядка. В наименьшей степени противовирусная активность ПАА проявлялась в клетках Vero, что может быть связано с отсутствием в данной клеточной линии системы выработки интерферонов. Исходя из полученных результатов опытов *in vitro*, ПАА можно рассматривать как противовирусный препарат широкого спектра действия в отношении не только вируса гриппа, но и других респираторных вирусов человека.

Ключевые слова: полиаллиламин, противовирусная активность, грипп, острая респираторная вирусная инфекция, клеточные линии, инфекционный титр.

Адрес для переписки:

Контаров Николай Александрович
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (495) 674-01-99. E-mail: kontarov@mail.ru

Contacts:

Nikolay A. Kontarov
105064, Russian Federation, Moscow, Small Kazenny Lane, 5a,
I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
Phone: +7 (495) 674-01-99. E-mail: kontarov@mail.ru

Для цитирования:

Контаров Н.А., Бахромеева А.А., Долгова Е.И., Погарская И.В.,
Контарова Е.О., Юминова Н.В. Противовирусная активность
полиаллиламина в отношении вирусов гриппа и ОРВИ в различных
клеточных культурах // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2.
С. 387–391. doi: 10.15789/2220-7619-PAA-17584

Citation:

Kontarov N.A., Bahromeeva A.A., Dolgova E.I., Pogarskaja I.V.,
Kontarova E.O., Juminova N.V. Polyallylamine antiviral activity against
influenza and acute respiratory viral infection in various cell cultures //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024,
vol. 14, no. 2, pp. 387–391. doi: 10.15789/2220-7619-PAA-17584

Работа выполнена в рамках программы «Russian Academic Excellence Project 5-100».

The study was carried out within the framework of the programme "Russian Academic Excellence Project 5-100".

© Контаров Н.А. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-PAA-17584>

POLYALLYLAMINE ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST INFLUENZA AND ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTION IN VARIOUS CELL CULTURES

Kontarov N.A.^{a,b}, Bahromeeva A.A.^b, Dolgova E.I.^b, Pogarskaja I.V.^b, Kontarova E.O.^c, Juminova N.V.^b

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

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

^c Federal Scientific and Clinical Centre of the Federal Medical-Biological Agency of Russia (Hospital No. 83), Moscow, Russian Federation

Abstract. Acute respiratory viral infections, including influenza, comprise the most common group of seasonal viral infections. Influenza is the most common and dangerous viral infection. The only way to control it is influenza vaccination. Regarding infections caused by parainfluenza and respiratory syncytial virus, only symptomatic treatment is available. Influenza virus quickly bypasses post-vaccination immunity due to its ability to antigenic drift and genetic reassortment. Available antiviral drugs quickly lose effectiveness, especially in relation to highly contagious influenza virus strains. The aim of the study was to create chemotherapeutic agent with a multi-layered effect on all viral structures: surface proteins, lipid membrane and ribonucleoprotein. Such drugs include polyelectrolytes (PE), particularly, polyallylamine (PAA), which showed strong virus-inhibiting effect in combination with low cytotoxicity against several influenza strains in MDCK cell culture and as well as measles virus in Vero cell culture. *Materials and methods.* In this work, an extended study on PAA antiviral activity and cytotoxicity was carried out using three influenza virus strains in A549 cell line, parainfluenza virus type 3 (HPIV-3) and respiratory syncytial virus (RSV) in A549, HEp-2, Vero, L-41, MA-104 cell lines. *Results.* It was shown that influenza and RSV were the most sensitive to PAA, so that virus activity decreased by 3 orders of magnitude in human lung carcinoma cells A549. The lowest antiviral activity was registered in Vero cells, which may be because it lacks interferon production system. Based on the results of in vitro experiments, PAA can be considered as a broad-spectrum antiviral drug not only against influenza, but also other human respiratory viruses.

Key words: polyallylamine, antiviral activity, influenza, acute respiratory viral infection, cell lines, infectious titer.

Введение

На сегодняшний день трудно назвать в мире страну, в которой не были бы отмечены случаи заболевания гриппом [4, 9, 10]. Радикальных химиопрепаратов для лечения гриппа и ОРВИ на данный момент не существует. Основными факторами отсутствия таких химических соединений является природная изменчивость вирусной популяции, высокая вариабельность генома и генетическая предрасположенность к многочисленным точечным мутациям. В связи с этим, необходимо осуществлять поиск химиопрепаратов с широким спектром действия: как в отношении поверхностных антигенных белков, так и вирусной мембраны. К таким соединениям можно отнести различные ПЭ, в частности, ПАА, которые обладают повреждающим действием на вторичную структуру белка, ферментов и вирусную мембрану. При этом для ПАА выявлена противовирусная активность в отношении нескольких вирусов [1, 2, 3, 5]. В данной работе проведено исследование цитотоксичности и противовирусной активности ПАА в различных концентрациях в отношении трех штаммов вируса гриппа и двух респираторных вирусов HPIV-3 и RSV на нескольких клеточных линиях различного происхождения. Показан вирусингибирующий эффект в совокупности с невысокой цитотоксичностью ПАА в отношении всех вирусов, культивируемых в перmissive клеточных линиях, причем наибольшая противовирусная активность наблюдалась в культуре клеток легочного происхождения A549.

Материалы и методы

Вирусы и клетки. В исследовании использовали следующие вирусы из коллекции вирусных штаммов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова:

- HPIV-3;
- RSV;
- вирус гриппа A/Bangkok/1/1979(H3N2);
- вирус гриппа A/ВЧП/Вейбридж(H7N7);
- вирус гриппа A/Маллард/Пенсильвания/10218/84(H5N2).

Вирусы накапливали в следующих клеточных культурах: вирусы гриппа — в клетках MDCK, RSV и HPIV-3 — в клетках MA-104. Для оценки цитотоксичности и вирусингибирующего действия ПАА использовали также клеточные линии A549, L-41, HEp-2 и Vero. Конечная концентрация клеток находилась в диапазоне от $1,6 \times 10^5$ до $2,4 \times 10^5$ кл/мл.

ПЭ. В работе использовали полиэлектролит — ПАА гидрохлорид с молекулярной массой $M_w = 6000$ Da (Sigma, США) (рис. 1).

Определение инфекционного титра вирусов. Из вирусосодержащей жидкости готовили серию десятикратных разведений на среде для культивирования клеток. Этими разведениями инфицировали клетки перmissive линии, рассеянные в 96-луночные планшеты. Далее планшеты инкубировали в атмосфере CO_2 при $36^\circ C$ в течение 72–120 ч в зависимости от вируса. По окончании инкубации оценивали наличие цитопатогенного действия в лунках. Инфекционный титр вируса рассчиты-

вали по методу Рида и Менча в модификации Томпсона и выражали в $\lg TЦД_{50}/мл$ [6].

Оценка цитотоксичности ПАА. Клетки используемых линий рассевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 14–24 ч до формирования монослоя, занимающего от 80 до 90% ростовой поверхности. Конечная концентрация растворов ПАА составляла 2–80 мкМ. В лунки планшетов вносили ПАА в указанном диапазоне концентраций и инкубировали 24 или 48 ч при 36°C в атмосфере 5% CO_2 . Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста [8] по истечению времени инкубации. В основе этого колориметрического метода лежит способность клеток метаболизировать тетразолиевый краситель МТТ, изменяя его окраску. Интенсивность окрашивания определяли спектрофотометрически через 24 и 48 часов при длине волны 590 нм. На основании полученных данных рассчитывали 50% цитотоксическую концентрацию (CC_{50}).

Оценка клеточной протективной активности ПАА. Клетки перmissive линий высевали на 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 14–24 ч до формирования монослоя, занимающего от 80 до 90% ростовой поверхности, ПАА вносили в указанном выше диапазоне концентраций в лунки планшетов с монослоем клеток в объеме 0,2 мл. Состояние клеточного монослоя оценивали методом фазово-контрастной микроскопии с помощью инвертированного микроскопа Биомед — 3И (Россия). Далее планшеты с клетками инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при 36°C в течение 60 мин. Затем вносили в лунки по 0,1 мл соответствующей вирусосодержащей жидкости (множественность инфекции составляла 0,01 $TЦД_{50}/кл$) в среде альфа-МЕМ и инкубировали в течение 48 ч в атмосфере CO_2 при 36°C. После инкубации клетки промывали средой МЕМ и проводили анализ жизнеспособности, как описано выше. На основании полученных данных рассчитывали значения 50% ингибирующей концентрации (IC_{50}), то есть концентрации химиопрепарата, при которой приводила к 50% снижению цитопатогенного действия вируса.

Изучение противовирусного действия ПАА. Клетки перmissive линий высевали на 24-луночные планшеты и инкубировали 14–24 ч до формирования монослоя, занимающего от 80 до 90% ростовой поверхности. Затем вносили в лунки по 0,1 мл соответствующей вирусосодержащей жидкости (множественность инфекции составляла 0,01 $TЦД_{50}/кл$) в среде альфа-МЕМ и инкубировали в течение 48–72 ч в атмосфере CO_2 при 36°C. После инкубации клетки промывали средой МЕМ и вносили ПАА в указанном выше диапазоне концентраций в лунки планшетов с монослоем клеток в объеме 0,5 мл. Планшеты инкубировали в атмосфере CO_2 при

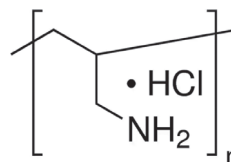


Рисунок 1. Структурная формула полиаллиламина гидрохлорида

Figure 1. Structural formula of polyallylamine hydrochloride

36°C в течение 48 ч. Затем в культуральной жидкости определяли инфекционный титр вируса.

Статистическая обработка результатов. Расчет значений CC_{50} и IC_{50} проводили с помощью программы GraphPad Prism 6.0. Индекс селективности (SI) рассчитывался как отношение CC_{50} к IC_{50} . Указанные параметры определялись для всех вирусов Количественной оценкой вирусингибирующего действия ПАА являлась величина T ($\lg TЦД_{50}/мл$), равная разности инфекционных титров до и после внесения ПАА в соответствующей концентрации. Статистическую обработку результатов, полученных из четырехкратных повторов каждого эксперимента, проводили стандартными методами с помощью Microsoft Excel 2010 с проверкой выборки на нормальное распределение с помощью критерия Колмогорова и расчета t -критерия, различия считали достоверными при 0,05. Противовирусный эффект считали терапевтически достоверным при $T2 \lg TЦД_{50}/мл$.

Результаты

Оценка цитотоксичности ПАА проведена в отношении клеточных линий MDCK, A549, MA-104, L-41, HEp-2 и Vero. В табл. 1 приведены полученные результаты.

Из полученных результатов видно, что наибольшей чувствительностью к токсическому действию ПАА обладала клеточная линия MA-104, для которой наблюдалась самое низкое значение CC_{50} уже через 24 ч инкубации с химиопрепаратом. Все остальные клеточные линии обладали меньшей чувствительностью к ПАА.

Результаты оценки противовирусного действия ПАА в отношении штаммов вируса гриппа, культивируемого в клетках A549, приведены в табл. 2 и на рис. 2, представлены в виде значений IC_{50} , SI и кинетики изменения инфекционного титра, T .

Из полученных результатов видно зависимость от концентрации ПАА достоверное снижение инфекционного титра на 2,5–3 порядка для трех штаммов вируса гриппа. Наибольшую чувствительность к химиопрепарату, судя по значениям IC_{50} и SI, проявил штамм А/Маллард/Пенсильвания/10218/84 (H5N2). Для клеточной линии MDCK такое снижение инфекционности

Таблица 1. Цитотоксичность ПАА в отношении различных клеточных линий

Table 1. PAA cytotoxicity in various cell lines

Срок инкубации, ч Incubation period, hours	CC ₅₀ , мкМ CC ₅₀ , μM					
	L-41	Vero	MA-104	HEp-2	A549	MDCK
24	38±1,8	50±1,9	12±1,3	42±1,7	44±1,4	34± 1,1
72	57±1,5	74±2,1	28±1,6	65±2,0	69±1,8	61±1,6

Таблица 2. Противовирусная активность ПАА в отношении штаммов вируса гриппа в культуре клеток A549

Table 2. PAA antiviral activity against influenza virus strains in A549 cell culture

Вирусы/Viruses	CC ₅₀ , мкМ CC ₅₀ , μM	SI
A/Bangkok/1/1979(H3N2)	5,3±0,2	13
A/FPV/Weybridge(H7N7)	4,6±0,1	15
A/Mallard/Pennsylvania/10218/84(H5N2)	3,0±0,2	23

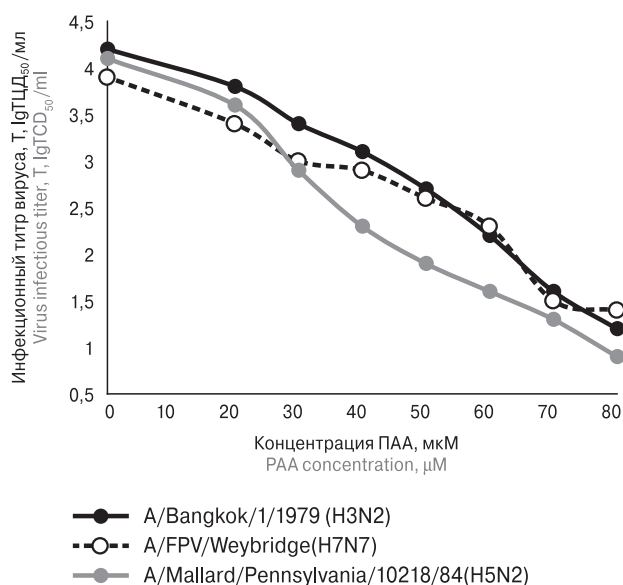
**Рисунок 2. Кинетика изменения инфекционного титра штаммов вируса гриппа при добавлении различных концентраций ПАА**

Figure 2. Kinetic changes in influenza virus strain infectious titer in response to varying PAA concentrations

вируса наблюдалось только к 7 суткам [5], что указывает на более эффективное подавления размножения вируса гриппа в эпителиальных клетках респираторного тракта по сравнению с эпителиальными клетками другого происхождения.

Следующим этапом исследования явилось изучение вирусингибирующего действия ПАА в отношении HPIV-3 и RSV в различных культурах клеток. В табл. 3 приведены количественные характеристики вирусингибирующего действия ПАА: снижение инфекционного титра вирусов (Т) при различных значениях IC₅₀ в соответствующей клеточной линии.

Обсуждение

Как видно из приведенных результатов, вирусингибирующее действие ПАА было различным для пяти респираторных вирусов и зависело от типа клеточной линии. Для использованных культур клеток максимальное вирусингибирующее действие проявлялось в культуре A549 для обоих вирусов. Поскольку клеточная линия A549 эпителиального происхождения из респираторного тракта человека, максимальный противовирусный эффект от ПАА следует ожидать при размножении респираторных вирусов в легких человека и соответственно при лечении вирусных пневмоний. Минимальное подавление вирусной активности наблюдалось для клеточной линии Vero, что может быть связано с тем, что данная клеточная линия является дефицитной по выработке интерферонов [7]. В результате этого в данной клеточной линии не могут быть в полной мере реализованы реакции неспецифического иммунитета, такие как индукция интерферона с последующим связыванием его с рецепторами, активацией ин-

Таблица 3. Вирус ингибирующее действие ПАА в отношении респираторных вирусов в различных клеточных линиях

Table 3. PAA virus inhibitory effect against respiratory viruses in various cell lines

Культура клеток Cell line	HPIV-3		RSV	
	CC ₅₀ , мкМ CC ₅₀ , μM	ΔТ, IgTCID ₅₀ /мл ΔT, IgTCID ₅₀ /ml	CC ₅₀ , мкМ CC ₅₀ , μM	ΔТ, IgTCID ₅₀ /мл ΔT, IgTCID ₅₀ /ml
A549	4,9±0,4	2,6	4,2±0,3	2,9
Vero	16,2±1,2	0,4	9,3±0,4	1,2
L-41	10,5±0,9	1,3	7,6±0,2	1,8
MA-104	9,6±0,6	1,4	6,8±0,5	2,2
HEp-2	6,4±0,8	1,6	5,2±0,2	2,4

терферонстимулирующих генов, запускающих иммунный ответ.

Таким образом, используемый в работе химиопрепарат ПАА проявлял выраженную противовирусную активность в отношении вируса гриппа и других респираторных вирусов в различных клеточных линиях, что связано, как было ранее нами показано в отношении вируса гриппа [5], с наличием множественного механизма противовирусного действия, заключающегося не только в инактивации связанного поверхностных антигенных белков, но и с структурными изменениями вирусной мембраны.

Следует отметить, что наибольшая противовирусная активность ПАА наблюдалась в клеточной линии A549, имеющей легочное происхождение и максимально приближенной к природной мишени этих вирусов. На основании полученных результатов, можно заключить, что применение химиопрепарата ПАА возможно в качестве как профилактического, так и лечебного средства против гриппа и ОРВИ.

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Artyushenko S.V., Kontarov N.A., Yuminova N.V., Zverev V.V., Kontarova E.O., Balaev N.V. Influence of polyelectrolytes on measles virus infectivity. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, vol. 88, no. 4, pp. 36–40.
2. Ciejka J., Botwina P., Nowakowska M., Szczubialka K., Pyrc K. Synthetic sulfonated derivatives of poly(allylamine hydrochloride) as inhibitors of human metapneumovirus. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 3: e0214646. doi: 10.1371/journal.pone.0214646
3. Ciejka J., Milewska A., Wytrwal M., Wojarski J., Golda A., Ochman M., Nowakowska M., Szczubialka K., Pyrc K. Novel Polyanions Inhibiting Replication of Influenza Viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2016, vol. 60, no. 4, pp. 1955–1966. doi: 10.1128/AAC.02183-15
4. Ghebrehewet S., MacPherson P., Ho A. Influenza. *BMJ*, 2016, vol. 355: i6258. doi: 10.1136/bmj.i6258
5. Kontarov N.A., Ermakova A.A., Grebionkina N.S., Yuminova N.V., Zverev V.V. The study of the antiviral activity of polyelectrolytes with respect to the influenza virus. *Problems of Virology*, 2015, vol. 60, no. 4, pp. 5–9.
6. Mahy B.W.J. Virology: a practical approach. *IRL Press*, 1985. 338 p.
7. Mosca J.D., Pitha P.M. Transcriptional and posttranscriptional regulation of exogenous human beta interferon gene in simian cells defective in interferon synthesis. *Mol. Cell Biol.*, 1986, vol. 6, no. 6, pp. 2279–2283. doi: 10.1128/mcb.6.6.2279-2283.1986
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 1983, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
9. Nypaver C., Dehlinger C., Carter C. Influenza and Influenza Vaccine: A Review. *J. Midwifery Womens Health*, 2021, vol. 66, no. 1, pp. 45–53. doi: 10.1111/jmwh.13203
10. Peteranderl C., Herold S., Schmoltd C. Human Influenza Virus Infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 2016, vol. 37, no. 4, pp. 487–500. doi: 10.1055/s-0036-1584801

Авторы:

Контаров Н.А., к.б.н., доцент кафедры медицинской и биологической физики ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия; ведущий научный сотрудник отдела вирусологии им. О.Г. Анджаридзе ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Бахромеева А.А., младший научный сотрудник лаборатории детских вирусных инфекций отдела вирусологии им. О.Г. Анджаридзе ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Долгова Е.И., младший научный сотрудник лаборатории детских вирусных инфекций отдела вирусологии им. О.Г. Анджаридзе ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Погарская И.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории детских вирусных инфекций отдела вирусологии им. О.Г. Анджаридзе ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Контарова Е.О., к.м.н., врач лучевой диагностики ФНЦК Федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства (Больница № 83), Москва, Россия
Юминова Н.В., д.б.н., зам. руководителя отдела вирусологии им. О.Г. Анджаридзе и профессор отдела аспирантуры ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Kontarov N.A., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Medical and Biological Physics, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of Childhood Viral Infections, O.G. Andzhaparidze Virology Department, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Bahromeeva A.A., Junior Researcher, Laboratory of Childhood Viral Infections, O.G. Andzhaparidze Virology Department, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Dolgova E.I., Junior Researcher, Laboratory of Childhood Viral Infections, O.G. Andzhaparidze Virology Department, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Pogarskya I.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Childhood Viral Infections, O.G. Andzhaparidze Virology Department, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Kontarova E.O., PhD (Medicine), Radiologist, Federal Scientific and Clinical Centre of the Federal Medical-Biological Agency of Russia (Hospital No. 83), Moscow, Russian Federation;
Juminova N.V., DSc (Biology), Deputy Head of the O.G. Andzhaparidze Virology Department and Professor of the Postgraduate Department, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.01.2024
 Отправлена на доработку 21.03.2024
 Принята к печати 15.05.2024

Received 30.01.2024
 Revision received 21.03.2024
 Accepted 15.05.2024

CASE PRESENTATION OF URINARY TRACT INFECTION BY *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*

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. *Stenotrophomonas maltophilia* is an emerging aerobic, non-fermentative, gram-negative multidrug-resistant global opportunistic bacillus. *S. maltophilia* causes a wide range of infections including respiratory tract infections, blood stream infections and, less commonly, biliary tract infections, skin and soft tissue infections, as well as bone and joint infections. It is increasingly being reported to cause urinary tract infections (UTIs). As for the case report, a 87-year-old male patient visited the Biopathology Laboratory of Nikea Primary Healthcare Center, Piraeus, Greece, for routine examination, being referred by the family doctor (GP). Patient history revealed diabetes mellitus type 2, arterial hypertension, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, hyperuricemia, chronic obstructive pulmonary disease, diagnosed before 30 years prostate cancer Gleasongrade 6, operated before 15 years, followed by hormone therapy and radiation therapy. Patient history also revealed urinary tract stones with 3 episodes of obstructive pyelonephritis during the last 5 years, followed by hospital admissions and administration of intravenous antibiotic treatment. During the hospital admissions, he had a permanent bladder catheter and received special antimicrobial treatment, for various microorganisms detected in his urine samples, such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterococcus faecalis*. Urinary incontinence has been a symptom for 15 years, after the prostate cancer surgery. Moreover, during the last 5 years, the patient faced many difficulties in his daily life because of the urinary incontinence. The situation was managed by bladder catheterisation, which further worsened his condition with recurrent UTIs and new episodes of pyelonephritis with subsequent hospitalization. Urinalysis showed proteinuria, intense pyuria, abundance of micro-organisms and abundance of red blood cells. The urine culture grew monomicrobial *Stenotrophomonas maltophilia* > 10⁵ CFU/ml. The bacterium was identified by the RapID™ REMEL ONE identification system (Thermo Fisher Scientific). Antimicrobial susceptibility testing revealed susceptibility to Trimethoprim/Sulfamethoxazole, Levofloxacin, Ceftriaxone and moderate susceptibility to Ciprofloxacin and Norfloxacin. The patient received treatment with Trimethoprim/Sulfamethoxazole.

Key words: urinary tract infections (UTIs), pathogen, *Stenotrophomonas maltophilia*, chemoprophylaxis, treatment, monomicrobia.

Адрес для переписки:

Антония Мурцику
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., Мурцику А. Редкий случай
инфекции мочевых путей, вызванной *Stenotrophomonas maltophilia* //
Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 392–396. doi: 10.15789/2220-
7619-CPO-12109

Citation:

Seitopoulou C., Stamouli M., Kalliora G., Mourtzikou A. Case presentation
of urinary tract infection by *Stenotrophomonas maltophilia* // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2,
pp. 392–396. doi: 10.15789/2220-7619-CPO-12109

РЕДКИЙ СЛУЧАЙ ИНФЕКЦИИ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ, ВЫЗВАННОЙ *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*

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. *Stenotrophomonas maltophilia* является новой аэробной, неферментирующей, грамтрицательной, полирезистентной глобальной условно-патогенной палочкой. *S. maltophilia* вызывает широкий круг инфекций, включая инфекции дыхательных путей, инфекции кровяного русла и, реже, инфекции желчевыводящих путей, инфекции кожи и мягких тканей, а также инфекции костей и суставов. Все чаще сообщается, что она вызывает инфекции мочевыводящих путей (ИМП). В настоящей работе описывается 87-летний пациент мужского пола, посетивший лабораторию биопатологии Центра первичной медико-санитарной помощи Никея, Пирей, Греция, для планового осмотра по направлению семейного врача (GP). В анамнезе больного выявлен сахарный диабет 2 типа, артериальная гипертензия, гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, гиперурикемия, хроническая обструктивная болезнь легких, рак предстательной железы по Глисону 6 баллов, диагностированный в возрасте менее 30 лет, оперированный менее 15 лет назад, с последующим проведением гормональной и лучевой терапии. В анамнезе пациента также были выявлены камни мочевыводящих путей и 3 эпизода обструктивного пиелонефрита за последние 5 лет с последующей госпитализацией и назначением внутривенного лечения антибиотиками. Во время госпитализации ему был установлен постоянный катетер мочевого пузыря, с назначением специального противомикробного лечения при выявлении различных микроорганизмов, обнаруженных в образцах мочи: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Enterococcus faecalis*. Недержание мочи наблюдалось в течение 15 лет после операции по поводу рака простаты. Более того, в течение последних 5 лет пациент испытывал многочисленные трудности в повседневной жизни из-за недержания мочи, что удалось нивелировать путем катетеризации мочевого пузыря, что еще больше ухудшило состояние пациента рецидивами ИМП и новыми эпизодами пиелонефрита с последующей госпитализацией. Анализ мочи выявил протеинурию, выраженную пиурию, множественные микроорганизмы и эритроциты. В посевах мочи обнаружен мономикробный штамм *Stenotrophomonas maltophilia* > 10⁵ КОЕ/мл, идентифицированной с помощью системы RapID™ REMEL ONE (Thermo Fisher Scientific). При тестировании на чувствительность к противомикробным препаратам выявлена чувствительность к триметоприму/сульфаметоксазолу, левофлоксацину, цефтриаксону и умеренная чувствительность к ципрофлоксацину и норфлоксацину. Пациент получал лечение триметопримом/сульфаметоксазолом.

Ключевые слова: инфекции мочевыводящих путей, возбудитель, *Stenotrophomonas maltophilia*, химиопрофилактика, лечение, мономикробные препараты.

Introduction

Stenotrophomonas maltophilia is an emerging aerobic, non-fermentative, gram-negative multidrug-resistant global opportunistic bacillus. Usually found in aqueous habitats, as well as in animals, foods and water sources. *S. maltophilia* causes a wide range of infections including respiratory tract infections, blood stream infections and, less commonly, biliary tract infections, skin and soft tissue infections, as well as bone and joint infections [3, 8]. It is increasingly being reported to cause urinary tract infections (UTIs). The aim of our study is to present a UTI case, caused by *S. maltophilia*.

Stenotrophomonas maltophilia represents the fourth most common pathogen among nonfermenting gram-negative bacteria (following *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., and *Burkholderia cepacia* complex), with a reported incidence of 7.1 to 37.7 cases/10 000 discharges (regarding nosocomial infections).

S. maltophilia usually must bypass normal host defenses to cause human infection. For example, if an irrigation solution becomes colonized with this organism, irrigating an open wound can cause colonization or infection of the wound. *S. maltophilia* is usually incapable of causing disease in healthy hosts without the assistance of invasive medical devices that bypass normal host defenses.

Risk factors associated with *S. maltophilia* infection have been defined and may include underlying malignancy, immunosuppressant therapy, cystic fibrosis, Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), HIV infection, neutropenia, mechanical ventilation, prior colonization with *Stenotrophomonas*, central venous catheter, genitourinary catheter, continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD), recent surgery, trauma, prolonged hospitalization, ICU admission, and exposure to broad-spectrum antibiotics, third or fourth generation cephalosporins and carbapenems, and hyperalimentation.

Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia is a multidrug-resistant gram-negative bacillus that is an opportunistic pathogen particularly among hospitalized patients. *S. maltophilia* infections have been associated with high morbidity and mortality in severely immunocompromised and debilitated individuals, with overall mortality rates ranging from 21% to 69%.

Treatment of *S. maltophilia* infections is difficult because this organism presents low susceptibility to antibiotics.

The mainstay of treatment for *Stenotrophomonas* infections is trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) and it remains the current drug of choice. Fluoroquinolones (FQs) have *in vitro* activity against *S. maltophilia*.

Case report

A 87-year-old male patient visited the Biopathology Laboratory of Nikea Primary Healthcare Center, Piraeus, Greece, for routine examination, being referred by the family doctor. Patient history revealed diabetes mellitus type 2, arterial hypertension, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, hyperuricemia, chronic obstructive pulmonary disease, diagnosed before 30 years, prostate cancer Gleason grade 6, operated before 15 years, followed by hormone therapy and radiation therapy. Patient history also revealed urinary tract stones with 3 episodes of obstructive pyelonephritis in the last 5 years, followed by hospital admissions and administration of intravenous antibiotic treatment. There were underlying diseases (risk factors) such as: a) diabetes mellitus type 2, b) arterial hypertension, c) hypercholesterolemia, d) hypertriglyceridemia, e) hyper-

uricemia, f) chronic obstructive pulmonary disease diagnosed 30 years ago, g) prostate cancer Gleason grade 6 operated 15 years ago, h) followed by hormone therapy, i) and radiation therapy, j) urinary tract stones with 3 episodes of obstructive pyelonephritis in the last 5 years and k) urinary incontinence the last 5 years. During the 3 times hospital admissions, he had a permanent bladder catheter and received special antimicrobial treatment, for various microorganisms detected in his urine samples, such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterococcus faecalis*. During the hospital admissions (3 episodes of obstructive pyelonephritis in the last 5 years) he had a permanent bladder catheter and received special antimicrobial treatment, for various microorganisms detected in his urine samples, such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterococcus faecalis*. There is no data base for the treatment that he received, because he was treated in hospital. He came to Nikea Primary Healthcare Center afterwards for routine examination, being referred by the family doctor. Urinary incontinence has been a symptom for 15 years, after the prostate cancer surgery. Moreover, the last 5 years the patient faced many difficulties in his daily life because of the urinary incontinence. Patient history, including urinary tract stones, with 3 episodes of obstructive pyelonephritis in the last 5 years, followed by hospital admissions where bladder catheterization was done. The situation was managed by bladder catheterisation, which further worsened his condition with recurrent UTIs and new episodes of pyelonephritis with subsequent hospitalization. The patient had also received a 6 month treatment of chemoprophylaxis with Nitrofurantoin (Furoilin). The laboratory per-

remel ERIC™ *Electronic RapID Compendium*

Laboratory: My Laboratory Ref No: 23.0000201
User: admin Report Date: 12/4/2023

RapID NF Plus Identification Report

Microcode: 611250

- ADH	+ PHS	+ aGLU	- GLU	+ GGT	- IND
+ TRD	- NAG	- ONPG	+ PRO	- TRY	- NO3
+ EST	- aGLU	- URE	- PYR	+ BANA	- OXI

IDENTIFICATION = *Sten. maltophilia*

Choice(s)	Probability	Bioscore	Contraindicated Tests
<i>Sten. maltophilia</i>	99,99%	1/19	None

Probability Level: Satisfactory BioFrequency: Acceptable

Widely distributed in nature and a variety of clinical specimens. Found in urinary, respiratory, and wound infections. Previously designated *Pseudomonas* or *Xanthomonas maltophilia*.

Figure. Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* by RapID™ REMEL ONE

formed 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). The urinalysis described in the study was taken on 11 April 2023. Next day, *Stenotrophomonas maltophilia* was the only pathogen identified. The bacterium was identified by the RapID™ REMEL ONE identification system (Thermo Fisher Scientific) on 12 April 2023. The patient received treatment with Trimethoprim/Sulfamethoxazole, and he was cured. There were no subsequent tests after the identification by the RapID™ REMEL ONE identification system.

Results

Urinalysis showed proteinuria, intense pyuria, abundance of micro-organisms and abundance of red blood cells. The urine culture grew monomicrobial *Stenotrophomonas maltophilia* > 10⁵ CFU/ml. The bacterium was identified by the RapID™ REMEL ONE identification system (Thermo Fisher Scientific) (Fig.). Antimicrobial susceptibility testing revealed susceptibility to Trimethoprim/Sulfamethoxazole, Levofloxacin, Ceftriaxone and moderate susceptibility to Ciprofloxacin and Norfloxacin (Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol). The patient received treatment with Trimethoprim/Sulfamethoxazole.

Discussion

Stenotrophomonas maltophilia, formerly named *Xanthomonas maltophilia* or *Pseudomonas maltophilia*, causes various infectious in immunocompromised individuals, which can be complicated by septic shock, respiratory failure, pulmonary hemorrhage, metastatic cellulitis, tissue necrosis that may be extensive, septic thrombophlebitis, disseminated infection, and death [4, 5]. Risk factors for infection by *S. maltophilia* include malignancy, the presence of indwelling catheters, chronic respiratory disease, chemotherapy, immunosuppressive therapy,

prolonged antibiotic use and long-term hospitalization or admission to ICU [6]. Our study is to present a UTI case report, caused by *S. maltophilia*. Our results are in accordance to the literature references. According to Umar et al., males with mean age between 43 and 85 years, are more prone to developing UTIs caused by *S. maltophilia* [9]. Moreover, patients with underlying urological or nephrological diseases, such as the patient included in the study, tend to develop a more severe illness [1, 7, 9]. In most cases presented in the literature, the bacterium was sensitive to Trimethoprim/Sulfamethoxazole [2, 9].

Conclusion

Stenotrophomonas maltophilia, formerly named *Xanthomonas maltophilia* or *Pseudomonas maltophilia*, causes various infectious in immunocompromised individuals, which can be complicated by septic shock, respiratory failure, pulmonary hemorrhage, metastatic cellulitis, tissue necrosis that may be extensive, septic thrombophlebitis, disseminated infection, and death [4, 5]. Risk factors for infection by *S. maltophilia* include malignancy, the presence of indwelling catheters, chronic respiratory disease, chemotherapy, immunosuppressive therapy, prolonged antibiotic use and long-term hospitalization or admission to ICU [6]. Our results are in accordance to the literature. According to Umar et al., males with mean age between 43 and 85 years, are more prone to developing UTIs caused by *S. maltophilia* [9]. Moreover, patients with underlying urological or nephrological diseases, such as the patient included in the study, tend to develop a more severe illness [1, 7, 9]. In most cases presented in the literature, the bacterium was sensitive to Trimethoprim/Sulfamethoxazole [2, 9]. As a conclusion, accurate identification and susceptibility testing of this emerging pathogen are critical for the management of infected patients and prevention of spread of this emerging pathogen. Accurate identification and susceptibility testing of this emerging pathogen are critical for the management of infected patients and prevention of spread of this emerging pathogen.

References

1. Agri H., Karthikeyan R., Kiranmayee B., Jayakumar V., Yadav A., Vinodh Kumar O.R., Sinha D.K., Singh B.R. *Stenotrophomonas maltophilia*: an overlooked enemy disguised as a friend. *Acta Scientific Microbiology*, 2022, vol. 5, no. 11, pp. 68–80. doi: 10.31080/asmi.2022.05.1165
2. Alqahtani J.M. Emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* nosocomial isolates in a Saudi children's hospital Risk factors and clinical characteristics. *Saudi Medical Journal*, 2017, vol. 38, no. 5, pp. 521–527. doi: 10.15537/smj.2017.5.16375
3. An S., Berg G. *Stenotrophomonas maltophilia*. *Trends Microbiol.*, 2018, vol. 26, no. 7, pp. 637–638. doi: 10.1016/j.tim.2018.04.006
4. Gupta P., Kale P., Khillan V. Resurgence of global opportunistic multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. *Indian J. Crit. Care Med.*, 2018, vol. 22, no. 7, pp. 503–508. doi: 10.4103/ijccm.IJCCM_106_18
5. Liu B., Tong S. An investigation of *Stenotrophomonas maltophilia*-positive culture caused by fiberoptic bronchoscope contamination. *BMC Infect. Dis.*, 2019, vol. 19, no. 1: 1072. doi: 10.1186/s12879-019-4670-3
6. Mojica M.F., Humphries R., Lipuma J.J., Mathers A.J., Rao G.G., Shelburne S.A., Fouts D.E., Van Duin D., Bonomo R.A. Clinical challenges treating *Stenotrophomonas maltophilia* infections: an update. *JAC Antimicrob. Resist.*, 2022, vol. 4, no. 3: dlac040. doi: 10.1093/jacamr/dlac040

7. Petca R.C., Dănău R.A., Popescu R.I., Damian D., Mareş C., Petca A., Jinga V. Xanthogranulomatous pyelonephritis caused by *Stenotrophomonas maltophilia*-the first case report and brief review. *Pathogens*. 2022, vol. 11, no. 1: 81. doi: 10.3390/pathogens11010081
8. Said M.S., Tirthani E., Lesho E. *Stenotrophomonas maltophilia*. In: StatPearls Treasure Island (FL). *StatPearls Publishing*, 2023.
9. Umar Z., Ashfaq S., Parikh A., Ilyas U., Foster A., Bhangal R., Khan J., Nassar M. *Stenotrophomonas maltophilia* and urinary tract infections: a systematic review. *Cureus*, 2022, vol. 14, no. 6: e26184. doi: 10.7759/cureus.26184

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, PhdC, 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, MPHМ, EurSpLM, PhD, Scientific Senior Supervisor, Laboratory of Molecular Diagnostics, GHNP "Agios Panteleimon", Piraeus, Greece.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://iimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

Основные виды статей, публикуемых в журнале

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, кДа и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их включения в текст статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка в отдельный файл. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
 - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
 - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
 - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
 - полное название статьи, направляемой в редакцию;
 - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
 - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
 - дата отправления работы.
 - 2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»).

- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
 - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
- 6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
- 7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
- 8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий, редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы www.e-library.ru . DOI статьи приводится в квадратных скобках после URL-адреса

4. Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://iimmun.ru>) в рубрике «Рецензирование» раздела «О журнале».

**Вы можете оформить подписку на журнал
 «Инфекция и иммунитет» через отделения связи:
 ООО «Урал-Пресс-Округ» и электронный каталог «Российская периодика»
 в сети Internet на сайте www.arpk.org.
 Подписной индекс 41392.
 Подписка на электронную версию журнала
 на сайте www.elibrary.ru**

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агафонова Е.В.	289	Неумоина Н.В.	351	Филатова Е.Н.	351
Алексеев Д.В.	306	Новиков В.В.	227	Филиппенко А.В.	267
Анисимова А.С.	267	Новиков Д.В.	227	Цимбалюкова М.В.	267
Аронова Н.В.	267	Новикова Н.А.	227	Чемисова О.С.	267
Ба М.Б.	381	Новицкая В.В.	371	Чирак Е.Л.	238
Бабайкина О.Н.	227	Ногойбаева К.А.	331	Чирак Е.Р.	238
Бахромеева А.А.	387	Носков А.К.	267	Чистякова А.К.	371
Белятич Л.И.	339	Нурдин И.	381	Шабалина А.В.	339
Боронбаева Э.К.	331	Омельченко Н.Д.	267	Шайхразиева Н.Д.	289
Бумбали С.	381	Павлович Н.В.	267	Шиминова Г.Г.	238
Вашукова М.А.	339	Перфилова К.М.	351	Юминова Н.В.	387
Винник А.В.	306	Погарская И.В.	387	Al-Nuaimy W.A.	365
Винник С.В.	306	Полев Д.Е.	339	Ataee Disfani R.	299
Воронина Е.В.	227	Попкова М.И.	351	Belaide K.	313
Гамалей С.Г.	238	Попов Н.В.	306	Borghabani R.	299
Гордеева С.А.	339	Постников М.А.	306	Davydenko V.S.	320
Даниленко Е.Д.	238	Прокопенко П.И.	371	Dovgaluk I.F.	251
Добрынина М.А.	277	Рак А.Я.	371	Fazlalipour M.	209
Долгова А.С.	339	Решетникова И.Д.	289	Ganj Bakhsh A.	299
Долгова Е.И.	387	Рубинштейн А.А.	371	Ghorat F.	299
Духовлинов И.В.	238	Руденко Л.Г.	371	Huynh H.K.T.	320
Заиченко И.Е.	227	Рябова Л.В.	277	Jalambadani Z.	299
Зурочка А.В.	277	Рябенкова А.А.	238	Kalliora G.	392
Иванова И.А.	267	Савин Т.В.	238	Kudlay D.A.	251
Исакова-Сивак И.Н.	371	Саенко А.И.	238	Kudryavtsev I.V.	251
Карташов М.Ю.	381	Сайтова А.Т.	339	Ling H.	251
Кашников А.Ю.	227	Самойлова А.А.	339	Malkova A.	251
Контаров Н.А.	387	Сафронова Э.А.	277	Mollaei H.R.	209
Контарова Е.О.	387	Светлова М.В.	227	Mourtzikou A.	392
Копать В.В.	238	Свирин К.А.	381	Ostankova Yu.V.	320
Костромитина А.Д.	371	Симбирцев А.С.	238	Reingardt D.E.	320
Котомина Т.С.	371	Смирнова Е.В.	339	Rubinstein A.A.	251
Краева Л.А.	339	Степанова Е.А.	371	Salloom D.F.	365
Кривошеина Е.И.	381	Сысоева Г.М.	238	Seba D.	313
Кудрявцев И.В.	371	Талаев В.Ю.	227	Seitopoulou C.	392
Лапин В.А.	227	Таранов О.С.	238	Serikova E.N.	320
Лямин А.В.	306	Терновой В.А.	381	Shchemelev A.N.	320
Матюшенко В.А.	371	Тобокалова С.Т.	331	Stamouli M.	392
Мелентьев Д.А.	227	Тотолян А.А.	238	Starshinova A.A.	251
Минаева С.В.	351	Труфанова А.А.	267	Starshinova A.Yu.	251
Михайлов Н.В.	339	Тюрин Ю.А.	289	Totolian A.A.	320
Мустафин И.Г.	289	Уткин О.В.	351	Zhuang M.	251
Найденова Е.В.	381	Ушкаленко Н.Д.	381		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

антибиотикорезистентность	339	ПГПЖ	331	HBsAg-negative hepatitis B	320
антитела класса IgG	381	полиаллиламин	387	hepatitis B viral markers	320
вакцина	227	полногеномное секвенирование	339	hepatitis B virus (HBV)	320
вирус гриппа	371	популяции Т-лимфоцитов	267	hVkp	339
вирус денге	381	приверженность АРТ	351	hybrid model	313
вирус желтой лихорадки	381	простой маргинальный гингивит	306	IFN γ	238
вирус Западного Нила	381	противовирусная активность	387	IgG	371
вирус Эпштейна-Барр	351	ПЦР	351	infection fatality rate	313
вирусоподобные частицы	227	РНК ВИЧ	351	infection safety	320
ВИЧ-инфекция	351	смертность	331	Iran	209, 299
внебольничная пневмония	267	социальное бремя	331	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	339
Гвинейская Республика	381	тканерезидентные Т-клетки памяти	371	logistic regression	299
гепатит В	331	Т-клеточный иммунный ответ	238	machine learning	313
гепатит D	331	Т-лимфоциты	277	matrix metalloproteinase	365
гипервирулентность	339	флавивирусы	381	mineral	299
грипп	387	цитокины	289	MMP-3	365
гуморальный иммунитет	277, 371	эффекторная память	371	monomicrobia	392
дендритные клетки	227	autoimmune diseases	365	oncogenesis	209
ДНК ВЭБ	351	autoimmunity	251	pathogen	392
живая гриппозная вакцина	371	B cell	251	performance	313
заболевания тканей пародонта	306	V-лимфоциты	267	prognosis	251
иммунная прослойка	381	V-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺	277	RA patients	365
иммунная система	277	blood donors	320	RNA virus	209
иммунный статус	267	cancer	209	Rs679620	365
инфекционный титр	387	carcinogen	209	sarcoidosis	251
клеточные линии	387	CD4 ⁺ Т-клетки	238	SARS-CoV-2	238, 289
коронавирус	227	CD4 ⁺ Т-лимфоциты	351	South Vietnam	320
коронавирусный антиген Cord_PS	238	CD8 ⁺ Т-клетки	238	statistical models	313
Кыргызская Республика	331	chemoprophylaxis	392	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	392
летальность	331	сКр	339	T cell	251
медицинские работники	289	clinically significant mutations	320	T _{EM}	371
микробиологическое исследование	306	cohort population	299	TLR-2- и TLR4-рецепторы	289
норовирус	227	COVID-19	238, 267, 277, 299, 306	treatment	392
нуклеопротеин	371	epidemiology	313	Treg	251
орофарингеальная микробиота	306	follicular Treg	251	Treg subsets	251
острая респираторная вирусная инфекция	387	forecast	313	TRM	371
острый коронарный синдром	277	gene polymorphism	365	tuberculosis	251
пародонтопатогенные комплексы	306	genotypes	320	tumor	209
		granulomatosis diseases	251	urinary tract infections (UTIs)	392
				vitamin	299

Иллюстрация к статье «Прогнозирование уровня летальности при COVID-19: оценка эффективности некоторых гибридных моделей» (авторы: Д. Себа, К. Белаиде) (с. 313–319)

Illustration for the article “Forecasting infection fatality rate of COVID-19: measuring the efficiency of several hybrid models” (authors: Seba D., Belaide K.) (pp. 313–319)

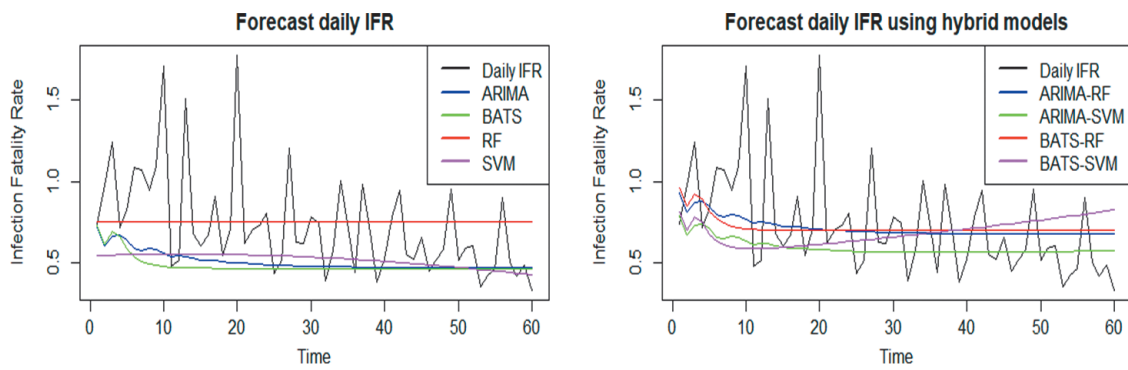


Figure 3. Daily IFR Forecasting with horizon $h = 60$

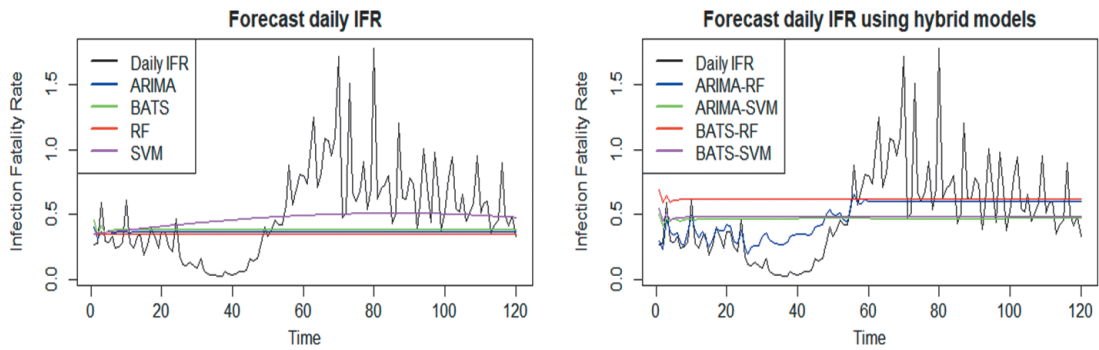


Figure 4. Daily IFR Forecasting with horizon $h = 120$

Подписной индекс:
Урал-Пресс – 41392

